UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN MECHANISMUS DES ZEITLICH BEGRENZTEN SUPERWACHSTUMS BEI AVENAKOLEOPTILEN NACH ANAEROBIOSE

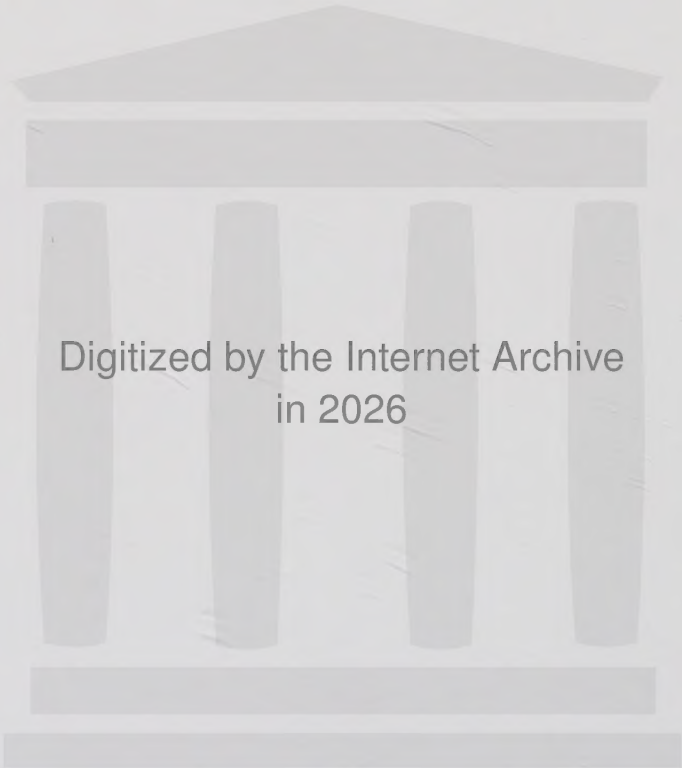
DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BRITTA ABELE
aus Nagold

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0003

UNTERSUCHUNGEN ZUM MOLEKULAREN MECHANISMUS DES ZEITLICH BEGRENZTEN SUPERWACHSTUMS BEI AVENAKOLEOPTILEN NACH ANAEROBIOSE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
BRITTA ABELE
aus Nagold

1983

Tag der mündlichen Prüfung	24.10.83
Dekan	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager
2. Berichterstatter	Prof. Dr. B. Schwemmle

Beim Abschluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Hager für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung besonders danken.
Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. Stransky für die Unterstützung in technischen Fragen sowie allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Allgemeine Botanik, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Chemikalien	4
2.2. Pflanzenmaterial und Anzucht	5
2.3. CO_2-Messungen mit dem URAS	5
2.4. Messung der O_2-Aufnahme	6
2.5. Analyse der Aminosäuren mit dem Aminosäurenanalysator	6
2.6. Bestimmung der Pyridinnucleotide	10
2.7. Lactatbestimmung	11
2.8. Äthanolbestimmung	11
2.9. Wachstumsmessungen am Wegaufnehmer	12
2.1o. Bestimmung des pH-Wertes	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt	14
3.2. Atmungsintensität von Avenakoleoptilen	16
3.2.1. CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme	16
3.3. Metaboliten in Avenakoleoptilen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen	18
3.3.1. Äthanolgehalt	18
3.3.2. Pyridinnucleotide	20
3.3.3. Freie Aminosäuren	22
3.4. Der Einfluß verschiedener Substanzen auf das Wachstum und die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter aeroben und anaeroben Bedingungen	25
3.4.1. Wirkung von Cycloheximid	25
3.4.1.1. -auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt	25
3.4.1.2.- auf die CO_2-Abgabe	27

INSTITUT LEIPZIG

Seite

3.4.2. Einfluß von Diäthylstilbestrol 29

3.4.2.1.- auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt 29

3.4.2.2.- auf die CO_2-Abgabe 30

3.4.2.3.- auf das IES-Wachstum 31

3.4.3. Wirkung von Dicyclohexylcarbodiimid 32

3.4.3.1.-auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt 32

3.4.3.2.- auf die CO_2Abgabe 33

3.4.4. Einfluß von Fluoracetat 34

3.4.4.1.- auf die CO_2-Abgabe 34

3.4.4.2.- auf das Wachstum von Avenakoleoptilen 35

3.5. Die Beziehung zwischen Lactatbildung und ANA-Effekt bei Avenakoleoptilen Der Einfluß von Fluorid 39

3.5.1.- auf die CO_2-Abgabe 39

3.5.2.- auf den ANA-Effekt beim Wachstum 41

3.5.3.- auf das Wachstum unter Luft 44

3.5.4.- auf die Lactatbildung unter Anaerobiose 45

3.6. Wirkung von 2-Naphtylacetat auf das Wachstum von Avenakoleoptilen 46

3.7. Einfluß von 2-Naphtylacetat und Fluoracetat auf den pH-Wert bei Avenakoleoptilen 49

3.8. Untersuchungen zum ANA-Effekt mit Koleoptilen von Zea mays 51

3.8.1. Einfluß anaerober Bedingungen auf das Wachstum 51

3.8.2. Lactatbildung unter Anaerobiose 52

4. Diskussion 53

5. Zusammenfassung 67

6. Literaturverzeichnis 70

7. Abkürzungen 80

1. Einleitung

Die molekularen Mechanismen, die beim hormoninduzierten Streckungswachstum eine Rolle spielen, sind noch weitgehend unbekannt. Dies ist umso verwunderlicher, als das wichtigste Wuchshormon, nämlich die Indol-3-essigsäure bereits Ende der Zwanziger Jahre von Söding, Went u.a. indirekt nachgewiesen und von Kögl 1934 in seiner molekularen Struktur aufgeklärt worden ist.

Die augenblicklich diskutierten Hypothesen, die sich mit den Elementen der Kausalkette des Auxin-induzierten Streckungswachstums beschäftigen, gehen einmal davon aus, daß eine auxininduzierte Protonenextrusion durch das Plasmalemma in das Zellwandkompartiment erfolgt, wodurch eine Plastizitätserhöhung der Zellwand ausgelöst wird und damit eine Zellstreckung (Hager et al, 1971; Cleland,1971). Diese auxininduzierte pH-Erniedrigung in der Zellwand, die energieabhängig ist, wurde vielfach nachgewiesen (Cleland,1973, 1976; Hager et al, 1980; Jacobs und Ray, 1976; Rayle und Cleland, 1972, 1977).
Es wird aber auch ein mehr indirekter Mechanismus der Auxinwirkung diskutiert, nämlich eine Genaktivierung in Analogie zur Steroidwirkung bei Tieren. Tatsächlich lässt sich ein schnelles Erscheinen von spezifischen m-RNA-Molekülen nach Auxinzugabe zeigen (Zurfluh und Guilfoyle, 1982). Die Korrelation zwischen der Bildung der m-RNA und dem Wachstumseffekt ist jedoch unbefriedigend.

Wegen dieser immer noch herrschenden Unklarheiten über die Auslösung des Streckungswachstums hat ein Wachstumsphänomen Bedeutung erlangt, das bei Koleoptilen, bzw. Koleoptilsegmenten von Hafer beobachtet wurde (Krauss und Hager, 1976; Hager, 1980).
Nach einer Phase der Anaerobiose, während der kaum noch Streckungswachstum zu beobachten ist, zeigen diese Koleoptilen nach Wiederzufuhr von Sauerstoff 20 bis 30 Minuten lang eine Art Superwachstum; die Wachstumsgeschwindigkeit ist dabei 6 mal grösser als vor der anaeroben Behandlung. Nach diesem Wachstums-"ausstoß", der auch als ANA-Effekt (Anaerobiose-Aerobiose-Übergangseffekt) bezeichnet

wird, stellt sich die normale Wachstumsgeschwindigkeit wie vor Anaerobiose wieder ein.
Dies bedeutet, daß unter N_2-Behandlung eine Veränderung in den Zellen der Koleoptilen stattgefunden hat, die anschliessend unter Anwesenheit von Sauerstoff zum Superwachstum führt.

Die Untersuchung dieser Veränderungen könnte einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung des Streckungswachstums liefern. Im folgenden werden solche Untersuchungen dargelegt.

Ähnliche Wachstumssteigerungen nach Anaerobiose wurden an grünen Erbsenstengeln gezeigt und als "emergent-growth" beschrieben (Parrish und Davies, 1977). Unterschiede zum ANA-Effekt liegen u.a. in der Dauer des "emergent-growth", das mehrere Stunden anhält.

Von diesen durch Anaerobiose ausgelösten Steigerungen der Wachstumsgeschwindigkeit, sind wohl jene Effekte zu unterscheiden, welche nach einer hypertonischen Behandlung von Avenakoleoptilen beobachtet worden sind. Hier ist eine Art Aufholeffekt beim Wachstum festgestellt worden, der wohl anderer Natur als der ANA-Effekt ist. Eine Steigerung des Wachstums nach Mannitolbehandlung wurde durch Ray (1961) beobachtet, er führte dafür den Begriff des "stored-growth" ein. Weitere Untersuchungen zu diesem Effekt wurden durch Cleland und Rayle (1972) und Göring et al. (1978) durchgeführt.

Es war nun Ziel dieser Untersuchungen, die Vorstellungen über die Ursachen des ANA-Effekts zu erweitern und vor allem die Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen unter Anaerobiose aufzuzeigen, da diese für die Auslösung des Streckungswachstums von ausschlaggebender Bedeutung sein können.

Untersuchungen zum anaeroben Stoffwechsel gibt es vorwiegend in Verbindung mit der Überflutungstoleranz bei Pflanzen (Crawford und McManmon, 1968; Crawford, 1969; McManmon und Crawford, 1971). Solche Pflanzen überstehen eine längere Zeit der Anaerobiose (bei Überflutung) dadurch, daß sie kein Äthanol bilden sollen, und eine Umschaltung auf andere Fermentationsprodukte, wie Malat, erfolgt.
In diesem Zusammenhang erschienen auch Arbeiten, die sich mit den Veränderungen des Aminosäurestoffwechsels unter anaeroben Bedingungen auseinandersetzen. Hierbei wurden unterschiedliche Substanzen,wie z.B.

Lactat, Alanin und γ-Aminobuttersäure als Akkumulationsprodukte gefunden. Diese Befunde weisen auf eine grössere Komplexität der Vorgänge bei der Überflutungstoleranz der Pflanzen hin (Crawford, 1978, 1982; Smith und ap Rees, 1979; Davies, 1980 und darin enthaltene Referenzen). Nach Crawford soll die Art der Fermentation unter Anaerobiose für die Toleranz von Bedeutung sein, nach Smith und ap Rees jedoch die Variation der Fermentationprodukte.

In diesem Zusammenhang sollte auch eine Hypothese überprüft werden, die zeigt, daß eine durch Lactatbildung unter Anaerobiose bedingte Ansäuerung des Cytoplasmas zur Aktivierung von ATPasen am Plasmalemma und ER führen soll,die bei Vorhandensein von Sauerstoff zu dem beschriebenen Wachstums-"burst" führt. Solche, für das Wachstum verantwortliche ATPasen konnten bereits nachgewiesen oder wahrscheinlich gemacht werden (Beffagna et al.,1979; Hager et al.,1971, 1980; Hager und Helmle, 1981; Hodges, 1976; Perlin und Spanswick,1981; Stout und Cleland, 1982).
Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen stützen diese Vorstellung.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Pyruvat	Boehringer, Mannheim
ADH (Alkoholdehydrogenase)	
GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase)	
LDH (Lactatdehydrogenase)	
2-NA (2-Naphtylacetat)	Serva, Heidelberg
Cycloheximid	
PMS (Phenazinmethosulfat)	
IES (Indol-3-essigsäure)	
DES (Diäthylstilbestrol)	Sigma, München
Glycylglycin	
MES (2[N-Morpholino] ethane sulfonic acid)	

Für die Versuche wurden mit Ausnahme der hier aufgeführten Substanzen ausschliesslich analysenreine Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt verwendet.

2.2. Pflanzenmaterial und Anzucht

Für die Versuche wurden 1 cm lange Koleoptilsegmente ohne Primärblatt und Spitze von Avena sativa (Siegeshafer der Fa. Svalöv, Schweden) verwendet. Die Anzucht erfolgte in der Dunkelkammer bei 24°C. Das Saatgut wurde auf ca. 6 Schichten feuchtem Zellstoff ausgelegt, mit feuchtem Sägemehl bedeckt und die Keimlinge nach 5 - 6 Tagen zum Versuch verwendet.
Zur Anzucht von Zea mays (Inrakorn 2a, Deutsche Saatgut AG) wurde das Saatgut über Nacht gewässert und anschliessend bei 26°C auf feuchtem Zellstoff in der Dunkelkammer bei 90% Luftfeuchtigkeit unter dunkelgrünem Sicherheitslicht angezogen. Zur Unterdrückung des Hypokotylwachstums wurde 2 Stunden pro Tag mit Rotlicht belichtet. Zum Versuch wurden 1 cm lange Koleoptilsegmente ohne Primärblatt und Spitze verwendet.

2.3. CO_2-Messungen mit dem URAS

Zur Messung der CO_2-Abgabe bei Avenakoleoptilen wurden 50 Koleoptilsegmente (ca. 0,5 g FG) nach der Präparation in ein Glasgefäß (maximal 50 ml Fassungsvermögen) mit 10 ml MES-Puffer (5mM, pH 5.8) gegeben, kurz im Vakuum infiltriert, damit sie untertauchten und keine lufterfüllten Hohlräume mehr aufwiesen. Dann wurde das Gefäß mit einem Stopfen dicht verschlossen, der Zu- und Ableitung für den Gasstrom enthielt, und die CO_2-Abgabe im offenen System mit dem URAS (Ultrarot-Absorptionsschreiber der Fa. Beckmann, Modell 864) gemessen.
Dazu wurde mittels einer Membranpumpe (Fa. LKB) Luft durch eine Waschflasche mit konz. KOH geleitet, um den Gasstrom CO_2-frei zu halten, und mit 40 ml/min durch das Versuchsmedium geleitet, wo das von den Koleoptilen abgegebene CO_2 kontinuierlich gemessen wurde.
Um anaerobe Versuchsbedingungen herzustellen, wurde sauerstoffreier Stickstoff (Messer-Griesheim, Dortmund) mit der selben Methode durch das Inkubationsmedium geleitet.
Die vom URAS gemessenen CO_2-Werte wurden auf einem Schreiber (W + W Recorder) aufgezeichnet und anhand einer Eichkurve errechnet.

Bei Versuchen, die die Zugabe einer Substanz erforderten, erfolgte dies über Spritzen, die durch den Verschlußstopfen in das Versuchsmedium reichten. So konnte auch ein Auswechseln des ganzen Mediums erfolgen, ohne daß Außenluft in das Versuchsystem gelangte. Dazu wurden zwei Spritzen angeschlossen, von denen eine die neue Lösung, die vorher mit CO_2-freier Luft oder N_2 durchspült worden war, enthielt, während die andere zum Herausziehen des Mediums diente. Das kontinuierliche Durchströmen von Luft oder N_2 brauchte so nicht unterbrochen zu werden.
Der Versuch wurde jeweils gestartet, wenn die Koleoptilen eine konstante CO_2-Abgabe aufwiesen, was durchschnittlich nach 10 - 15 Minuten der Fall war.

2.4. Messung der O_2-Aufnahme

Die Sauerstoffaufnahme wurde mit dem Biological Oxygen Monitor (Modell 53, Yellow Springs Instrument Co; Schreiber W + W Recorder) im Wasserbad bei 30°C gemessen. Für den Versuch wurden 10 Avenakoleoptilsegmente in 10 ml MES-Puffer (5mM, pH 5.8) verwendet.

2.5. Analyse der Aminosäuren mit dem Aminosäurenanalysator

Extraktion

Avenakoleoptilsegmente (1 g FG) wurden nach Versuchsende schnell in flüssigem Stickstoff zermörsert. Das Homogenat wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 15 ml heissem Alkohol (80%) gegeben und 3 - 5 Minuten unter Rühren erhitzt und in Zentrifugenbecher überführt, wobei mit 5 ml Alkohol nachgespült wurde. Anschliessend wurde 5 Minuten bei 10 000 upm zentrifugiert, der Überstand aufbewahrt, das Pellet mit 10 ml heissem Alkohol (50%) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Dieser Überstand wurde zum ersten gegeben und das Pellet wiederum mit heissem Alkohol (30%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die vereinigten Überstände im Rotationsverdampfer bei 60°C getrocknet und in 5 ml Verdünnungspuffer (s.u.) aufgenommen.
Unlösliche Bestandteile wurden durch Membranfilter (0.45 µm Porenweite, Fa. Sartorius, Typ SM 11306) abgetrennt.

Die Auftrennung, Identifikation und quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mittels Ionenaustausch-Flüssigkeits-chromatographie und Detektion mit Ninhydrin. Als Gerät wurde der Amin Acid Analyser LC 6001 (Biotronic GmbH, Frankfurt) verwendet.

Harzbett	4 x 140 mm
Harz	BTC 4M
Vorwaschsäule	6 x 30 mm
Harz	BTC F
Pufferdurchflußrate	22 ml x h^{-1}
Ninhydrindurchflußrate	19 ml x h^{-1}
Temperatur T_1	39,6°C
Temperatur T_2	55,3°C

Tab. 1. Gerätedaten für das"Trennprogramm physiologische Flüssigkeiten".

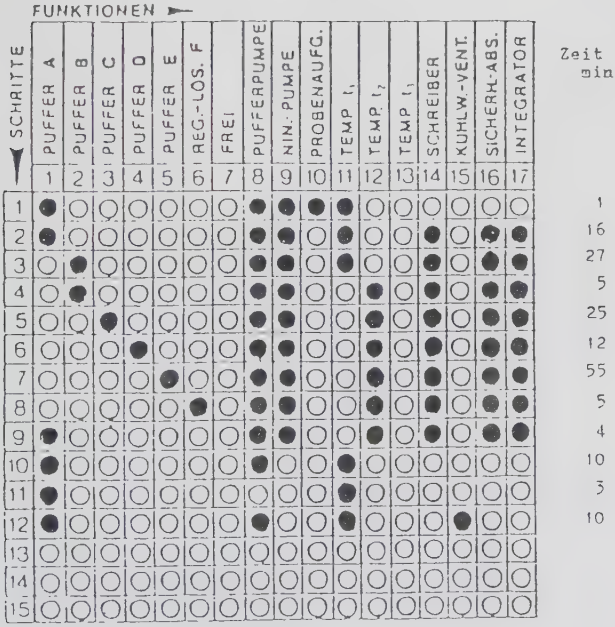


Abb. 1. Programmeinstellung "Trennprogramm physiologische Flüssigkeiten".

Für die Analyse der Proben wurden folgende Puffer und Reagenzien verwendet.

Puffer	A	B	C	D	E
LiOH x H_2O	10,08 g	10,08 g	16,78 g	16,78 g	16,78 g
Citronensäure x H_2O	25,22 g	25,22 g	25,22 g	25,22 g	25,22 g
LiCl	-	-	-	8,50 g	84,78 g
HCl	nach Bedarf zur pH-Einstellung				
Methanol	140 ml	100 ml	-	-	-
Brij 30%	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Phenol 80%	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Endvolumen	2,00 l	2,10 l	2,10 l	2,00 l	2,00 l
pH	2,68	3,20	3,60	4,00	3.40
Li^+-Konz.	0,12 M	0,11 M	0,19 M	0,30 M	1,20 M
Citrat-Konz.	0,06 M	0,06 M	0,06 M	0,06 M	0,06 M

Tab. 2. Puffer zur Elution der Aminosäuren

LiOH	6,30 g/l
Citronensäure-1-hydrat	21,01 g/l
HCl 37%	nach Bedarf zur pH-Einstellung
Phenol 80%	1 ml/l
Thiodiethanol	20 ml/l
pH	2,8

Tab. 3. Probenverdünnungspuffer

LiOH		25,2 g/21
Brij	30%	4 ml/21
Phenol	80%	2 ml/21

Tab. 4. Regenerierlösung

Natriumacetat	82,03 g/l
Essigsäure 100%	25,oo ml/l
NaOH (konz.)	nach Bedarf zur pH-Einst.
pH	5,51

Tab. 5. Natriumacetatpuffer für das Ninhydrinreagenz

Ethylenglycol-monomethylester	1500 ml/21
Ninhydrin	40 g/21
Na-acetat-Puffer	500 ml/21
$TiCl_3$ 15% in HCl	20 ml/21

Tab. 6. Ninhydrinreagenz

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch die automatische Integration der Peakflächen (photometrische Messung der Absorption bei 570 nm). Die relative Empfindlichkeit des Detektors für die einzelnen Aminosäuren wurde mit einem Standardgemisch von Aminosäuren (Amino-Acid-Standard, Benson Co., USA) bestimmt.

2.6. Bestimmung der Pyridinnucleotide

Für die Versuchsdurchführung wurden 1 cm lange Avenakoleoptilen ohne Primärblatt und Spitze verwendet (1 g FG). Zur Inkubation wurden sie in 50 ml MES-Puffer (5mM, pH 5.8) überführt. Anaerobe Bedingungen wurden durch kontinuierliches Begasen mit sauerstoffreiem Stickstoff (s.a. 2.3.) erreicht bzw. aerobe Bedingungen durch Begasen mit Luft. Die Versuche wurden immer im Wasserbad bei 30°C durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Koleoptilen schnell mit einem Sieb abgefangen und in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff homogenisiert.
Die Extraktion und Bestimmung der Nucleotide erfolgte in Anlehnung an Hager (1980).
Um die reduzierten Formen (NAD(P)H) zu bestimmen, wurde das Homogenat in 50% alkoholischer 0,1 N KOH bei 60°- 80°C 5 Minuten gerührt.
Die Extrakte wurden nach Überführung in Zentrifugenbecher 10 Minuten zentrifugiert (18 000 upm, 0°C). Vom Überstand wurden 8 ml abgenommen und mit 2,5 ml Puffer (Triäthanolamin-hydrochlorid, 0,5M; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 0,1 M; KH_2PO_4, 0,4 M; pH 5,8) verdünnt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 - 7,6 eingestellt.
Zur Bestimmung der oxidierten Formen (NAD(P)) wurde das Homogenat in 50% alkoholische 0,1 M HCl gerührt. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben aufgeführt. Der pH-Wert wurde auf 7,2 - 7,4 eingestellt.
Die Proben zur Bestimmung der reduzierten Pyridinnucleotide wurden mit einer DPIP-Lösung (6mg/2ml) titriert um reduzierende Substanzen zu oxidieren.
Die oxidierten Formen der Nucleotide oxidieren Alkohol durch ADH (für NAD^+), bzw. Glucose-6-Phosphat durch G6PDH (für $NADP^+$). Die dadurch reduzierten Nucleotide werden durch PMS reoxidiert, während der Wasserstoff von DPIP aufgenommen wird. Die Geschwindigkeit der DPIP-Reduktion bei 610 nm ist ein Maß für die Konzentration der Pyridinnucleotide.
Testansätze:
Für NAD(H): 0,8 ml Aqua bidest., 1,5 ml Phosphatpuffer (0,34 M; pH 7,4), 0,05 ml Äthanol, 0,05 ml neutralisierte 50% KOH (für NADH) od. HCl (für NAD), 0,1 ml DPIP (2,5 mg/5ml), 0,1 ml PMS (12,5 ml/5ml), 0,3 ml Probenextrakt.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml ADH (200 U/mg, 1:10 verdünnt).
Für NADP(H): 0,8 ml Aqua bidest., 1,5 ml TRIS-Puffer (0,14 M; pH 8), 0,05 ml neutralisierte 50% alk. o,1 M KOH, 0,05 ml Glucose-6-Phosphat (52 mg/ml), 0,1 ml DPIP (2,5 mg/ml), 0,1 ml PMS (12,5 mg/ml), 0,3 ml Probenextrakt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml G6PDH (0,1 mg/ml).

2.7. Lactatbestimmung

Die Präparation und Inkubation der Koleoptilen erfolgte wie in 2.6. aufgeführt.
Das Homogenat wurde in 5 ml Perchlorsäure (5%) aufgenommen und unter öfterem Schütteln 1 Stunde auf Eis stehengelassen. Die anschliessende Zentrifugation (18000 upm, 10 Minuten, 0°C) ergab den Überstand, der zur Lactatbestimmung verwendet wurde. Diese erfolgte nach der enzymatischen Methode von Boehringer (1979).
Das Prinzip beruht darauf, daß Lactat in Gegenwart von Lactatdehydrogenase (LDH) durch NAD^+ zu Pyruvat oxidiert wird. Da das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten von Lactat liegt, kann man durch Abfangen des Pyruvats mittels Glutamat und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) dieses auf Seite des Pyruvats verschieben.
Bestimmungsansatz: 1 ml Puffer (Glycylglycin, 0,6 M; L-Glutamat 0,1M; pH 10)} 0,2 ml NAD-Lösung (47 mM), 0,02 ml GPT (10 mg/ml), 1,4 ml Aqua bidest., 0,1 ml Probe.
Die gebildete NADH-Menge wurde im Photometer (Varian, Serie 634) gegen Aqua bidest. gemessen und die Lactatmenge anhand einer Eichkurve bestimmt.

2.8. Äthanolbestimmung

Zur Bestimmung des Äthanolgehalts in Avenakoleoptilsegmenten, wurden diese wie in 2.6. präpariert und inkubiert. Die Bestimmung des Äthanols erfolgte nach der enzymatischen Methode von Boehringer (1979).

Das Prinzip beruht auf folgender Reaktion: Äthanol + NAD^+ $\xrightarrow{ADH}$ Acetaldehyd + NADH + H^+. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Äthanol und NAD. Durch NAD-Überschuss, alkalisches Milieu und Abfangen des Acetaldehyds durch Semicarbacid kann es auf die rechte Seite verschoben werden.
Der Bestimmungsansatz bestand aus 2,5 ml Puffer (Pyrophosphat, 75mM; Semicarbacid, 75mM; Glycin, 21mM; pH 8,7), 0,1 ml NAD-Lösung (16mM), 0,4 ml Aqua bidest., 0,02 ml ADH und 0,1 ml Probe. Die gebildete NADH-Menge diente als Maß für den Äthanolgehalt und wurde im Photometer gemessen. Eine Eichkurve diente zur Ermittlung der Äthanolmenge.

2.9. Wachstumsmessungen am Wegaufnehmer

Die Messung des zeitlichen Wachstumsverlaufs und damit die Längenzunahme von Avenakoleoptilen erfolgte über einen Inductive Displacement Transducer PR 9314-01 der Fa. Philips und wurde zeitabhängig von einem Schreiber registriert.
Dazu wurden 5, 1 cm lange, Koleoptilsegmente auf einer Glaskapillare aufgereiht und in eine Glasküvette mit 30 ml Inkubationsmedium (5mM MES, pH 5,8; mit und ohne Testsubstanzen, 30°C) überführt.
Anaerobe Bedingungen wurden durch Begasung mit sauerstoffreiem Stickstoff hergestellt. Dazu wurde eine feine Glaskapillare bis zum Boden der Versuchsküvette eingeführt, die auch eine Umschaltung auf Luftzufuhr erlaubte. War die Zugabe einer bestimmten Substanz erforderlich, dann wurde diese mittels einer Spritze zugegeben, wobei ein sofortiges Durchmischen des Mediums durch die kontinuierliche Begasung gewährleistet wurde.
Für Versuche mit Medienwechsel wurden die Koleoptilen für ca. 1 min mit Puffer gewaschen und anschliessend in frisches Medium überführt.

2.10. Bestimmung des pH-Wertes

Avenakoleoptilsegmente (1 cm, ohne Primärblatt und Spitze) wurden in 30 ml MES-Puffer (5mM, pH 5,8), mit und ohne Zusätze, je nach Versuchsbedingungen, überführt und kurz im Vakuum infiltriert um Lufthohlräume auszuschliessen. Nach entsprechender Inkubation im Wasserbad bei 30°C wurden die Segmente mit einem Sieb abgefangen, auf trockenen Zellstoff gelegt und abgetupft. Um den Hohlraum der Koleoptilen von noch anhaftendem Versuchsmedium zu befreien, wurden sie in einem kleinen Erlenmeyer, dessen Boden mit Zellstoff ausgelegt war, überführt und unter Vakuum gebracht.Die ausgetretene Flüssigkeit konnte so gleich von dem Zellstoff aufgezogen werden, so daß ein Zurückfliessen beim Beenden des Vakuums vermieden werden konnte.
Die Koleoptilen wurden anschliessend in ein Zentrifugenglas mit Glasfritteneinsatz (Ø 20 mm, Porengrösse 1, Fa. Robu-Glas) überführt und 30 Minuten bei 4500 upm, 2°C zentrifugiert (Sigma 2-K-D Zentrifuge). Der Glasfritteneinsatz ermöglichte eine Trennung der Koleoptilen und des austretenden Gewebepressaftes (ca. 0,5 ml), der zur pH-Messung in einer Mikro-pH-Elektrode (Ingold - Elektrode) diente.

3. Ergebnisse

3.1. Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt

Wurden Avenakoleoptilsegmente (in MES-Puffer,5mM, pH 5,8, 30°C) nach einer aeroben Phase 30 Minuten unter anaerobe Bedingungen gebracht (N_2-Begasung), dann trat nach kurzer Zeit eine Verminderung der Wachstumsrate auf annähernd Null ein. Nach anschliessender Sauerstoffzufuhr nahm die Wachstumsgeschwindigkeit sehr schnell auf das 6-fache gegenüber der Wachstumsrate vor der anaeroben Behandlung zu. Während der nächsten 20 Minuten fiel diese wieder annähernd auf den Anfangswert ab. Die Endlänge der anaerob behandelten Koleoptilen nach einer 80-minütigen Versuchsdauer betrug dabei das Doppelte gegenüber den Luftkontrollen zu dieser Zeit (Abb. 2 und 3).

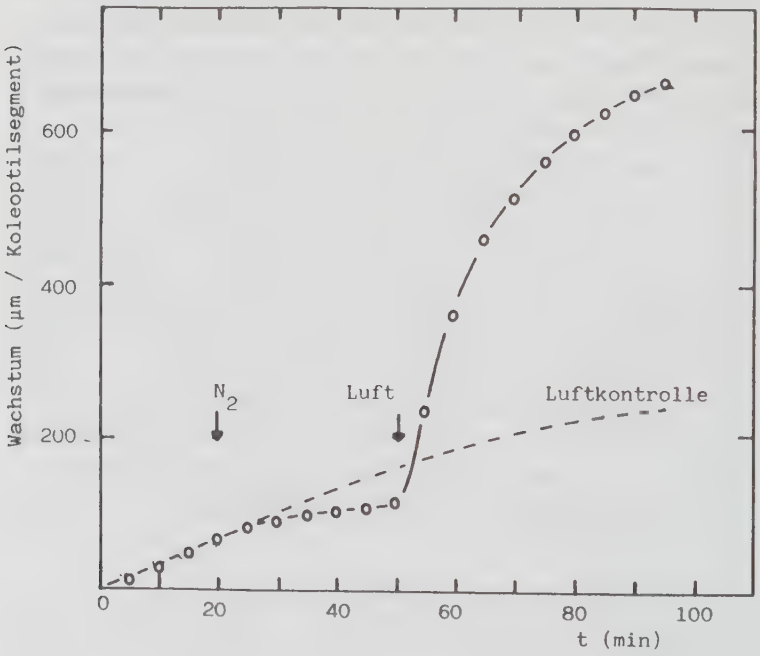


Abb. 2. Wachstumsverlauf 1 cm langer Avenakoleoptilsegmente vor, während und nach einer anaeroben Phase.
(5mM MES-Puffer, pH 5.8, 30°C)

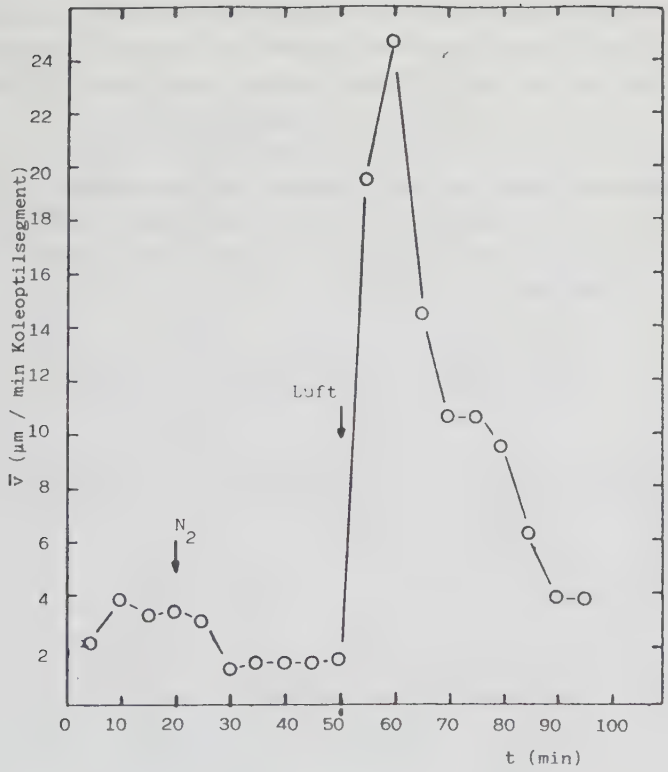


Abb. 3. Wachstumsrate 1 cm langer Avenakoleoptilsegmente unter aeroben, anaeroben und postanaeroben Bedingungen. (5mM MES, pH 5.8, 30°C)

3.2. Atmungsintensität von Avenakoleoptilen

3.2.1. CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme

Die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilsegmenten wurde nach 2.3. im URAS gemessen. Nach Überführung der Koleoptilen unter anaerobe Bedingungen nahm diese innerhalb von 15 Minuten auf fast die Hälfte ab und blieb während der weiteren 45 Minuten auf diesem Wert von 55% der Luftkontrolle bestehen. Wurde dann wieder Luft gegeben, stieg die CO_2--Abgabe schnell wieder an; nach 10 Minuten war ein Maximum erreicht, das 13% über der Kontrolle (100% = 0,4 µmol CO_2 x min^{-1} x gFG^{-1}) lag. Nach weiteren 20 min war die CO_2-Abgabe wieder auf den Wert der Luftkontrolle abgesunken (Abb. 4).

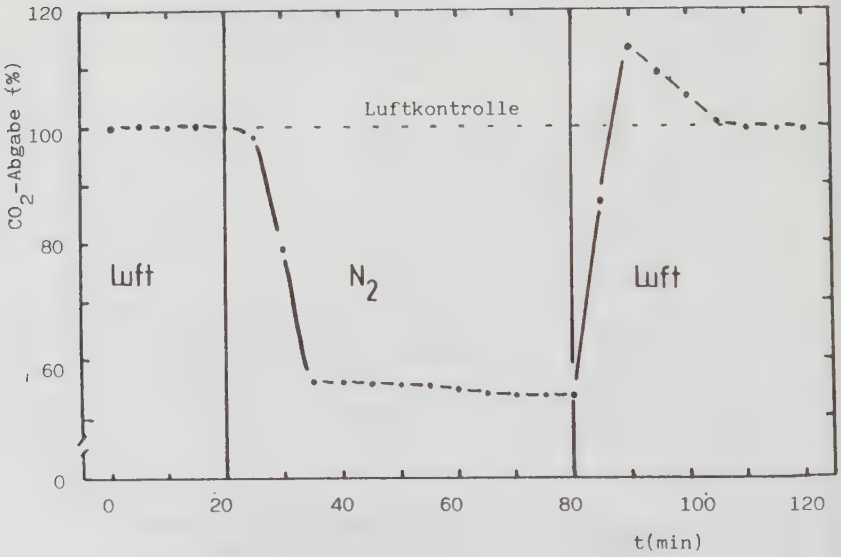


Abb. 4. CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter aeroben und anaeroben Bedingungen in 5mM MES, pH 5.8, 30°C.
(Luftkontrolle = 100% = 0,4 µmol CO_2/min gFG)

Anaerob behandelte Koleoptilen zeigten also in der postanaeroben Phase eine kurzfristige Steigerung der Atmungsintensität, deren Dauer im selben Zeitbereich liegt wie der Wachstumsburst nach Anaerobiose.

Eine entsprechende Steigerung konnte auch bei der Sauerstoffaufnahme gemessen werden (Abb. 5). Diese stieg nach anaerober Behandlung schnell auf 115% gegenüber der Kontrolle (100% = 0,4µmol O_2 x min^{-1} x gFG^{-1}) an und fiel dann ebenfalls wieder ab.

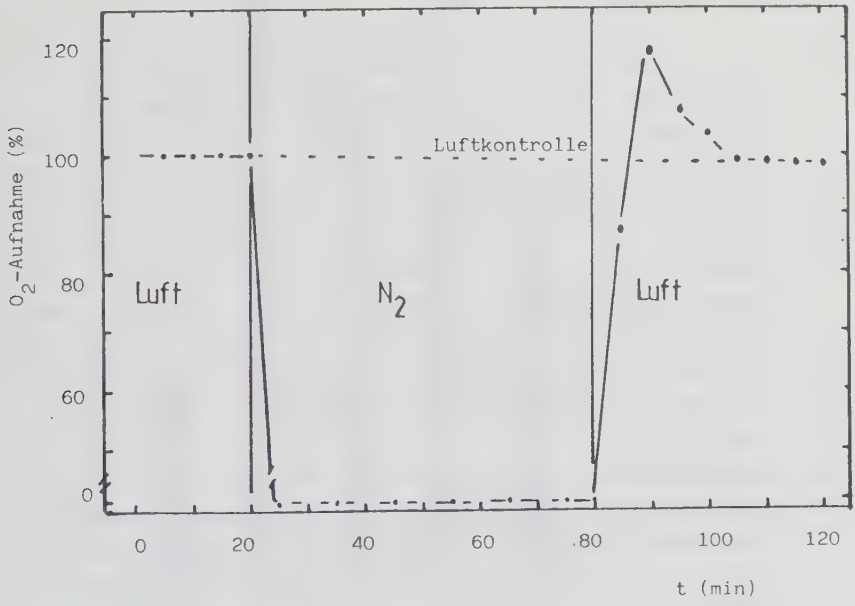


Abb.5. Sauerstoffaufnahme von Avenakoleoptilen vor und nach einer anaeroben Phase in 5mM MES, pH 5.8, 30°C.
Luftkontrolle = 0,4µmol O_2/min gFG.

3.3. Metaboliten in Avenakoleoptilen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen

Aus neueren Untersuchungen (Hager, 1980) ist bekannt, daß Avenakoleoptilen mit einem entsprechenden Gärungsverhlten (Lactatbildung, Abnahme des ATP-Spiegels) auf Anaerobiose reagieren.
Es sollte nun untersucht werden, ob noch weitere Veränderungen im Stoffwechsel als Reaktion auf den Sauerstoffentzug eintreten.

3.3.1. Äthanolgehalt

In den Versuchen über die Atmungsintensität von Avenakoleoptilen (3.2.1.), war festzustellen, daß die CO_2-Abgabe nur knapp auf die Hälfte der Luftkontrolle vermindert wurde, also noch O_2- unabhängige CO_2-abspaltende Reaktionen stattfinden. Als wesentlicher CO_2-Produzent kam hierbei die alkoholische Gärung in Frage.
Nach 1-stündiger Anaerobiose zeigte sich tatsächlich eine deutliche Zunahme des Äthanols in Avenakoleoptilen um annähernd das 3 1/2-fache gegenüber der Luftkontrolle (0,9µmol/gFG in der Kontrolle, 3,1µmol/gFG unter N_2). Wurde anschliessend wieder Luft gegeben, fiel der Gehalt an Äthanol innerhalb der nächsten 10 Minuten nur langsam wieder ab; erst nach 30 Minuten war der Wert auf die Hälfte vermindert worden. (Abb.6).
Um festzustellen, ob die Produktion von Äthanol durch die Avenakoleoptilen eventuell höher liegt und eine Abgabe ins Außenmedium stattfindet, wurde dieses daraufhin ebenfalls untersucht (Abb. 6). Bei Koleoptilen, die 1 Stunde anaerob inkubiert wurden, konnte Äthanol im Versuchsmedium gefunden werden, bei den entsprechenden Luftkontrollen nicht.
Der Äthanolgehalt im Außenmedium der anaeroben Koleoptilen stieg auf 1,4 µmol an, was 45% der Menge entspricht, die in den Koleoptilen gemessen wurde. Die Werte ergeben in den Koleoptilen eine Konzentration von 6 mM (Bezug: 0,5 ml Gewebepressaft, s. 2.10.) und für die Außenlösung 13,7 µM (≙ 0,007% $^{v}/_{v}$).

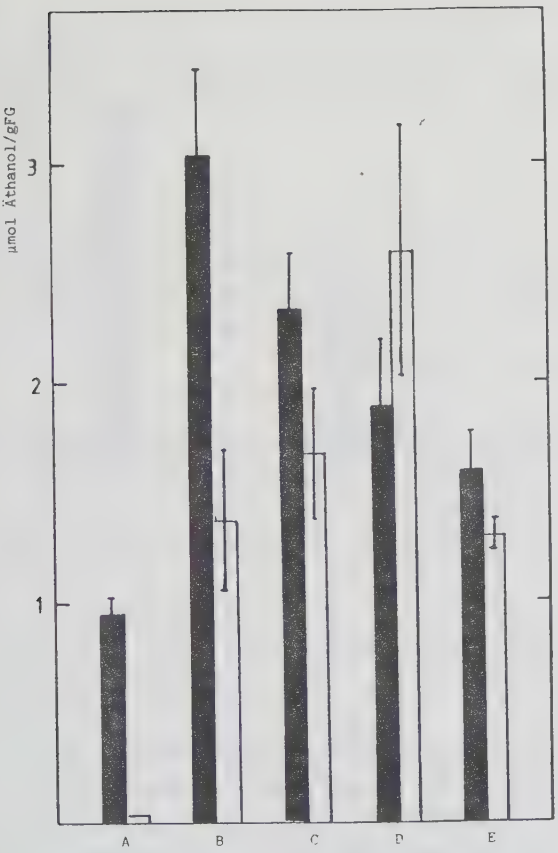


Abb. 6. Äthanolgehalt von Avenakoleoptilsegmenten(▬) und des Außenmediums (▭) nach anaerober Inkubation (N_2) in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.
A = Kontrolle unter Luft; B = 60 min N_2;
C = 60 min N_2 + 10 min Luft;
D = " + 20 " "
E = " + 30 " "

3.3.2. Pyridinnucleotide

Es ist bekannt, daß bei Avenakoleoptilen unter anaeroben Bedingungen eine Veränderung im Gehalt der reduzierten Formen der Pyridinnucleotide eintritt (Hager, 1980). Nun sollte untersucht werden, inwieweit sich dieselben Bedingungen auf den Gehalt der oxidierten Formen auswirkt (Abb.7).

$NADH_2$ und NAD^+

Der $NADH_2$-Gehalt nahm bei Avenakoleoptilen, die 1 Stunde anaerob inkubiert wurden, auf das Doppelte zu. Nach anschliessender Sauerstoffzufuhr fiel der Wert auf den der Kontrolle ab und blieb mit kleinen Schwankungen erhalten. Der NAD^+-Gehalt änderte sich unter denselben Versuchsbedingungen nur unbedeutend.

$NADPH_2$ und $NADP^+$

Der $NADPH_2$-Gehalt nahm nach 1-stündigem Sauerstoffentzug sehr stark ab (85 %). 20 Minuten nach anschliessender Luftgabe war der Wert der Luftkontrollen wieder annähernd erreicht.

Der $NADP^+$-Spiegel zeigte während des Versuchverlaufs keine maßgeblichen Veränderungen.

Im Ganzen war festzustellen, daß der Pool an NAD + NADH bei Avenakoleoptilen grösser ist, als der von NADP + NADPH, wobei unter aeroben Verhältnissen beim NAD die oxidierte Form überwiegt, beim NADP jedoch die reduzierte.

Unter Anaerobiose nimmt die Summe an NADPH + NADP um 8 nmol / g FG ab, die von NADH + NAD um rund denselben Wert zu. In der anschliessenden postanaeroben Phase werden annähernd wieder aerobe Verhältnisse erreicht. Während des Versuchszeitraums bleibt die Summe an Pyridinnucleotiden mit im Fehlerbereich liegenden Schwankungen konstant.

Das Verhältnis von NADH zu NADPH steigt unter anaeroben Bedingungen zugunsten des NADH auf über das 10-fache an. Nach Sauerstoffzufuhr wird der Anfangswert nach 20 Minuten wieder erreicht.

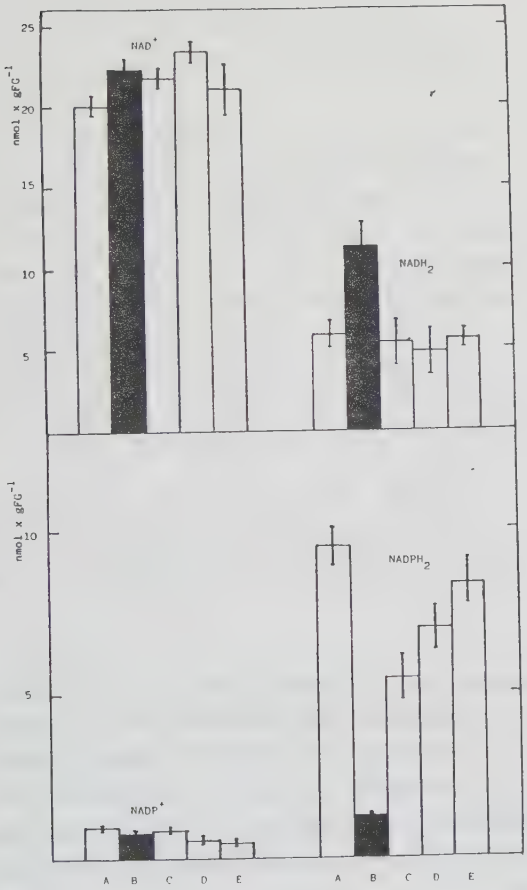


Abb.7. Gehalt an Pyridinnucleotiden in Avena-koleoptilen nach anaerober Inkubation in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.
A - Luftkontrolle, B - 60 min Anaerobiose(N_2)
C - 60 min N_2 + 5 min Luft,
D - " " " + 10 " " ,
E - " " " + 20 " " .

3.3.3. Freie Aminosäuren

Bei der Untersuchung der CO_2-Abgabe unter anaeroben Bedingungen zeigte sich, daß diese nur auf die Hälfte der Luftkontrolle reduziert wurde. Die Menge des gebildeten Äthanols reicht nicht aus, den hohen CO_2-Ausstoß zu erklären (3.3.1.).
Es war deshalb zu folgern, daß noch andere Decarboxylierungsreaktionen unter Anaerobiose stattfinden könnten, z.B. bei Aminosäuren. In der Literatur sind ähnliche Erscheinungen beschrieben worden. So wurde einer "Extra-CO_2"-Abgabe unter Anaerobiose u.a. die Bildung von γ-Aminobuttersäure aus Glutaminsäure (Effer und Ranson, 1967) zugeschrieben, und es wurde auch eine Zunahme der γ-Aminobuttersäurekonzentration gefunden, welche durch eine Aktivierung der Glutamat--Decarboxylase bedingt war (Streeter und Thompson, 1972 b, Inatomi und Slaughter, 1971). Andere Enzymaktivitätssteigerungen unter N_2, z.B. die der Oxalacetatdecarboxylase konnten ebenfalls gemessen werden (Streeter und Thompson, 1972).
In Tabelle 7 sind freie Aminosäuren, die in Avenakoleoptilen gefunden wurden, aufgelistet. In Abbildung 8 wurden die Aminosäuren aufgeführt, bei denen unter Anaerobiose deutliche Änderungen festgestellt werden konnten.

Asparaginsäure (ASP):
Der Anteil der Aminosäure nahm bei Avenakoleoptilen nach 1 Stunde Anaerobiose um über die Hälfte ab. Wurde anschliessend Luft gegeben, stieg der ASP-Spiegel innerhalb von 30 Minuten nur schwach wieder an; nach 20 Minuten war ein konstanter Wert erreicht. Man konnte feststellen, daß auch bei der Luftkontrolle der Wert für ASP nach dieser Zeit abgefallen war, den jedoch die anaerob behandelten Koleoptilen nicht mehr erreichten.

Alanin (ALA):
Der Anteil an ALA nahm nach 1-stündiger Anaerobiose auf das 3 1/2-fache zu. Nach erneuter Luftzufuhr erfolgte innerhalb von 10 Minuten eine Abnahme um die Hälfte und es wurde dann annähernd wieder der Wert der Luftkontrolle zu dieser Zeit erreicht.

Aminosäure	Kontrolle	1 Stunde N_2
Asparaginsäure	2,2	0,6
Threonin	6,1	6,0
Serin	3,8	3,4
Asparagin	47,6	45,0
Glutaminsäure	4,5	0,0
Glutamin	3,4	1,2
Glycin	1,8	2,1
Alanin	2,0	7,1
Valin	4,8	4,9
Isoleucin	1,8	1,9
Leucin	2,1	2,4
Tyrosin	0,7	1,0
Phenylalanin	1,9	1,9
γ-Aminobuttersäure	0,4	4,5

Tab. 7. Freie Aminosäuren in Avenakoleoptilen.
Angaben in % des Gesamtgehalts (12 - 15 µmol/gFG)

Glutaminsäure(GLU):
Nach anaerober Inkubation von 1 Stunde konnte in Avenakoleoptilen keine Glutaminsäure mehr gemessen werden. Erst nach anschliessender 20-minütiger Luftphase war wieder eine leichte Zunahme festzustellen.

Glutamin (GLN):
Der Glutamingehalt fiel nach Anaerobiose um 2/3 ab und erreichte nach 30 Minuten Luftzufuhr wieder den Wert der Luftkontrolle zu dieser Zeit.

γ-Aminobuttersäure (GABA):
Eine anaerobe Behandlung von Avenakoleoptilen bewirkte nach 1 Stunde eine über 10-fache Zunahme dieser Aminosäure, die bei den Luftkontrollen nur einen geringen Anteil hatte und sich während der Versuchszeit nicht änderte. Bei den anaerob behandelten Koleoptilen war jedoch in der postanaeroben Phase keine Abnahme auf den Kontrollwert innerhalb 30 Minuten festzustellen.

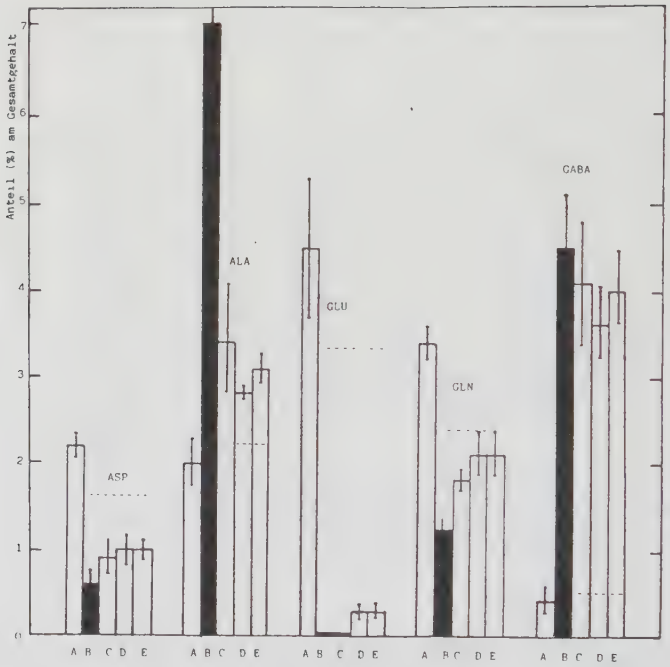


Abb. 8. Gehalt an freien Aminosäuren in Avenakoleoptilen nach anaerober Inkubation. (5 mM MES, pH 5.8, 30°C)
A - Luftkontrolle
B - 60 min Anaerobiose (N_2)
C - " + 10 min Luft
D - " + 20 "
E - " + 30 "
---- Luftkontrolle zu dieser Zeit
Der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren liegt zwischen 12 und 15 µmol x g FG^{-1}.

3.4. Der Einfluß verschiedener Substanzen auf das Wachstum und die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Es konnte gezeigt werden, daß das Auxin-induzierte Streckungswachstum durch Cycloheximid gehemmt werden kann (Cleland 1971, Penny, 1971, Bates und Cleland, 1979). Cycloheximid wurde hier als Hemmstoff der cytoplasmatischen Proteinsynthese eingesetzt.
Es werden jedoch auch andere Wirkungen angenommen. So wird die Hemmung des Auxin-induzierten Wachstums durch Cycloheximid auch auf Grund von Atmungshemmungen erklärt (Black und Dheidah, 1976). Weiter wird behauptet, daß Cycloheximid nicht die absolute Spezifität im zellulären Stoffwechsel besitzt (Ellis und MacDonald, 1970).
In diesem Zusammenhang sollte die Wirkung von Cycloheximid auf den ANA-Effekt untersucht werden.

Weiterhin war von Interesse, ob die postulierte ATP-abhängige Protonenpumpe (Hager et al.,1971, 1980) in vivo durch bekannte ATPase-Inhibitoren wie Diethylstilbestrol (DES) oder Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) beeinflußbar ist. Es ist bekannt, daß diese Substanzen in vitro ATPasen von Membranfraktionen hemmen (Balke und Hodges, 1979; Beffagna et al, 1979; Hager und Helmle, 1981).
Als Vergleich zu den Verhältnissen bei Anaerobiose wurde unter aeroben Bedingungen versucht, den Citratcyclus durch Fluoracetat, einen Hemmstoff der Aconitase, zu hemmen.

3.4.1. Wirkung von Cycloheximid

3.4.1.1. - auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt

Avenakoleoptilen wurde 10 Minuten vor einer anaeroben Phase Cycloheximid (CH, 100 µM) appliziert und während des weiteren Versuchverlaufs im Medium gelassen (Abb. 9). In der postanaeroben Phase erfolgte dann in den ersten 5 Minuten eine Wachstumssteigerung, die der der Kontrolle ohne Cycloheximidbehandlung entsprach.
Im weiteren Verlauf erfolgte jedoch kein so starker Anstieg mehr und der Gesamtzuwachs der cycloheximidbehandelten Koleoptilen

lag nach 80 Minuten Versuchsdauer mit 292 µm/Segment 20 % unter dem Wert der unbehandelten Koleoptilen mit 364 µm/ Segment Zuwachs. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden, ob Cycloheximid vor oder gleichzeitig mit Anaerobiosebeginn zugegeben wurde. Der Hemmstoff wird offensichtlich energieunhabhängig in die Zelle aufgenommen, also auch unter anaeroben Bedingungen.

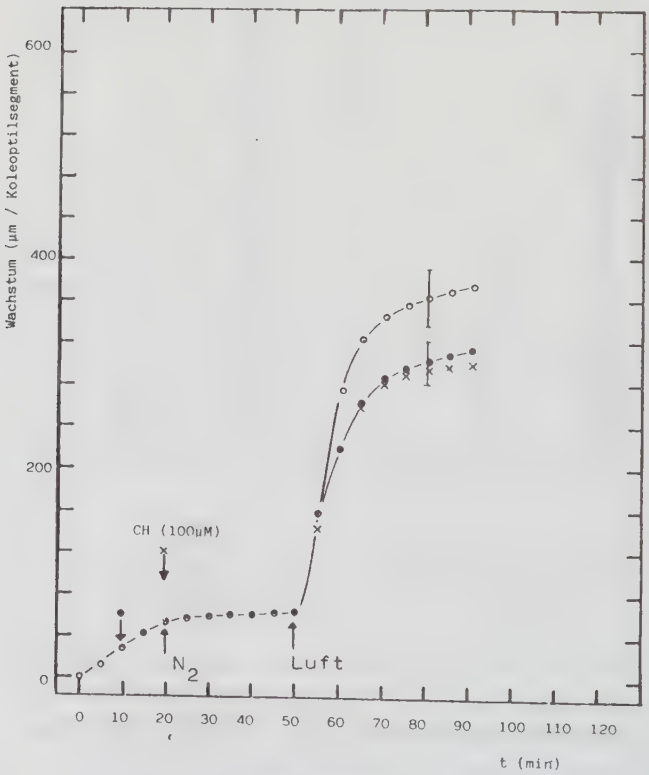


Abb. 9. Der Einfluß von Cycloheximid (CH, 100 µM) auf das Wachstum beim ANA-Effekt in 5 mM MES, pH 5.8, 30° C.

3.4.1.2. - auf die CO_2-Abgabe

Avenakoleoptilsegmenten wurde vor Anaerobiosebeginn Cycloheximid (100 µM) appliziert; die CO_2-Abgabe unter anaeroben Bedingungen änderte sich dabei gegenüber der Kontrolle ohne Cycloheximidbehandlung nicht. In der anschliessenden aeroben Phase stieg jedoch die CO_2-Abgabe nicht mehr so stark an, sondern erreichte ein Maximum, das 20 % unter dem Wert der Kontrolle lag. Dabei war durch verschiedene Zugabezeiten kein Unterschied festzustellen (Abb.10).

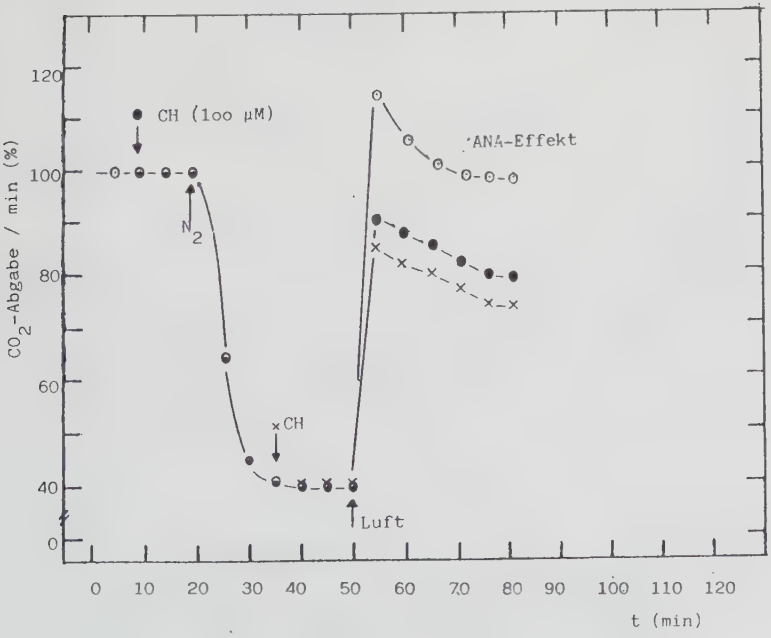


Abb. 10. Die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter dem Einfluß von Cycloheximid (CH, 100 µM) mit eingeschobener anaerober Phase.
(5 mM MES, pH 5.8, 30°C; 100 % CO_2 ≙ 0,4 µmol/gFG)

Wurde Cycloheximid unter aeroben Verhältnissen zu den Koleoptilen gegeben (Abb.11), so nahm nach 20 Minuten die CO_2-Abgabe langsam ab und nach 80-minütiger Versuchsdauer war eine 20%ige Hemmung gegenüber den unbehandelten Koleoptilen eingetreten.

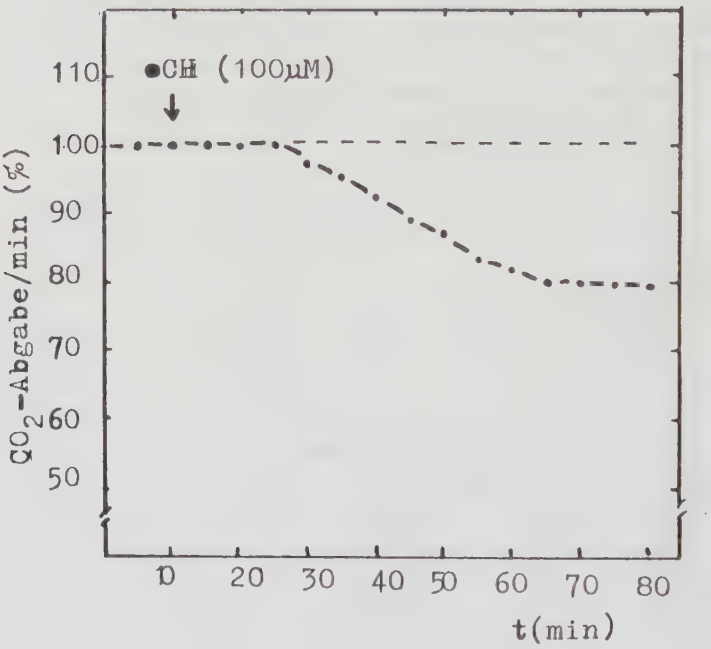


Abb. 11. Einfluß von Cycloheximid (CH, 100 µM) auf die CO_2-Abgabe unter Luft.
(5 mM MES, pH 5.8, 30°C; Luftkontrolle ohne CH= 100 % ≙ 0,4 µmol CO_2/min gFG)

3.4.2. Einfluß von Diäthylstilbestrol

3.4.2.1. - auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt

Avenakoleoptilen wurden vor Anaerobiosebeginn in Diäthylstilbestrol (DES, 17 µM) inkubiert, das während des weiteren Versuchverlaufs im Medium gelassen wurde. Das Wachstum in der postanaeroben Phase war gegenüber der Kontrolle ohne DES deutlich verändert (Abb.12). Innerhalb von 10 Minuten nach Luftzugabe erfolgte ein schneller Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit, dann trat eine deutliche Verlangsamung ein, so daß der Gesamtzuwachs der DES-behandelten Koleoptilen nach 80-minütiger Versuchsdauer um 34 % geringer war als bei den unbehandelten Koleoptilen.

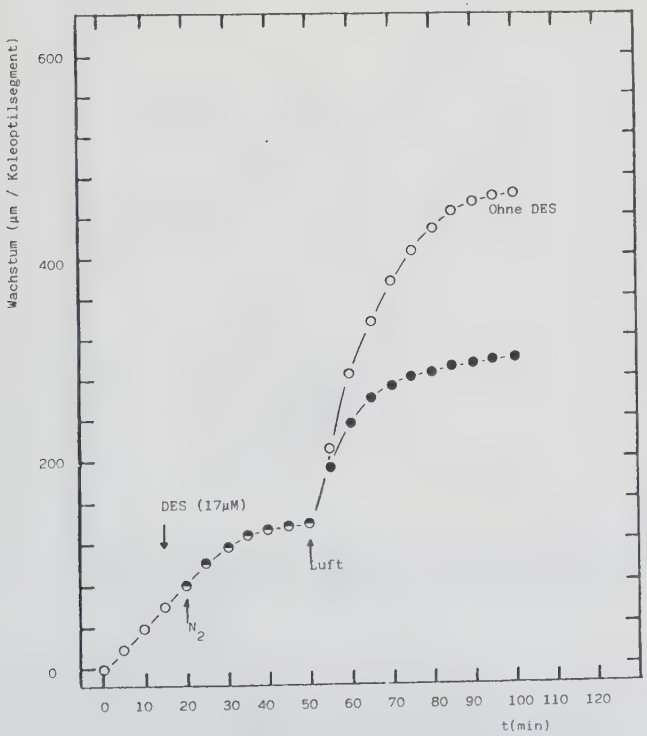


Abb. 12. Der Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt unter dem Einfluß von Diäthylstilbestrol (DES, 17 µM) in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.

3.4.2.2. - auf die CO_2-Abgabe

Untersuchte man den Einfluß von DES auf die Atmungsintensität, so konnte man feststellen, daß unter aeroben Bedingungen die CO_2-Abgabe nach einer lag-Phase von 10 Minuten gehemmt wurde und nach einer Einwirkungszeit von 40 Minuten eine 20 %ige Hemmung eingetreten war (Abb.13).

Wurde nach DES-Gabe eine anaerobe Phase eingeschoben, so stieg die CO_2-Abgabe unter anschliessender Sauerstoffzufuhr nur langsam wieder an und es wurde ein Maximum erreicht, das 20 % unter dem Wert der unbehandelten Koleoptilen lag (Abb.13).

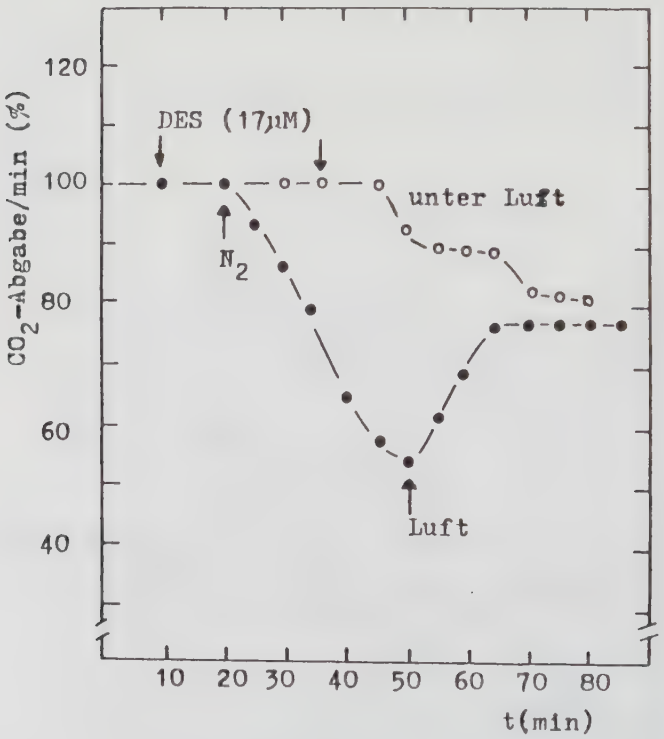


Abb.13. Einfluß von Diäthylstilbestrol (DES, 17 µM) auf die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen. (● - Zugabe vor Anaerobiose; o - Zugabe unter Luft; Kontrolle = 100% ≙ 0,4 µmol CO_2/gFG; 5 mM MES, pH 5.8, 30°C)

3.4.2.3. - auf das IES-Wachstum

Wird DES (17 µM) gleichzeitig mit IES (20µM) zu Avenakoleoptilen gegeben, dann erfolgt, nach der bekannten lag-Phase noch ein kurzfristiger Wachstumsanstieg, der jedoch im weiteren Verlauf deutlich gehemmt wird (Abb.14).

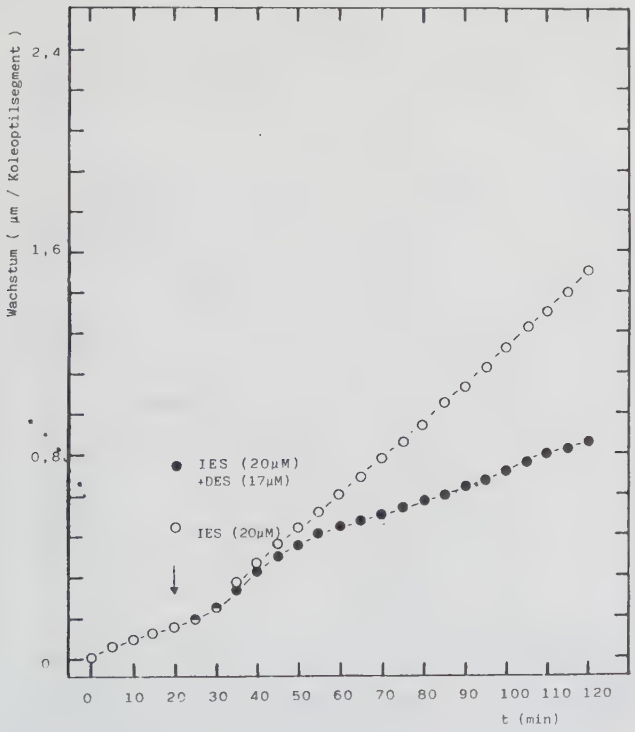


Abb. 14. Die Wirkung von Diäthylstilbestrol (DES, 17 µM) auf das IES-induzierte Wachstum bei Avenakoleoptilen. (IES, 20 µM; 5 mM MES, pH 5.8; 30°C)

3.4.3. Wirkung von Dicyclohexylcarbodiimid

3.4.3.1. - auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt

Wurde Avenakoleoptilsegmenten unter anaeroben Bedingungen Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD, 10 µM) appliziert, so war nach anschliessender Luftgabe nur eine schwache Zunahme des Wachstums festzustellen und der Zuwachs nach 80 Minuten Versuchsdauer gegenüber den unbehandelten Koleoptilen um 50 % vermindert. Eine anschliessende IES-Gabe (20µM) konnte auch keine Wachstumssteigerung mehr bewirken (Abb.15).

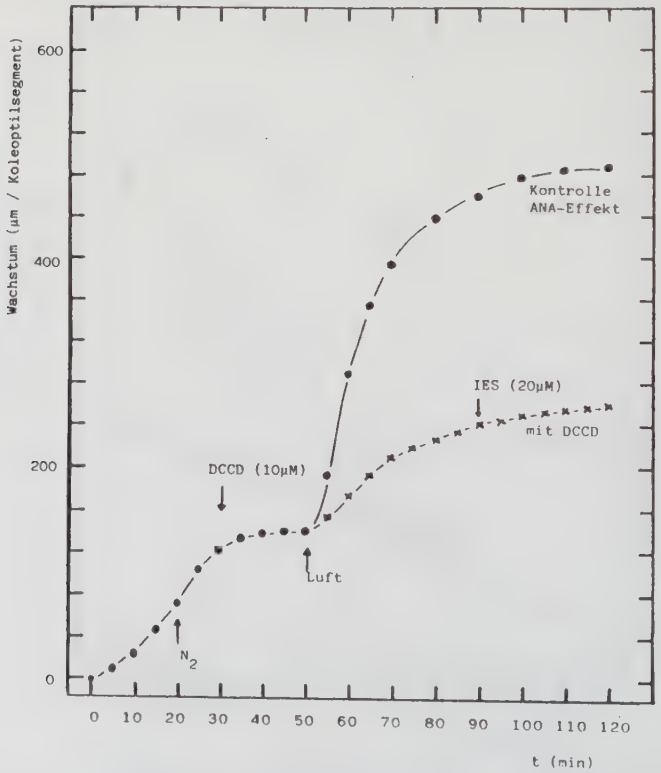


Abb. 15. Der Einfluß von DCCD (Dicyclohexylcarbodiimid, 10 µM) auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.

3.4.3.2. - auf die CO_2-Abgabe

DCCD (10 µM) bewirkte unter aeroben Bedingungen nach einer lag-Phase von 15 Minuten eine Zunahme der CO_2-Abgabe bei Avenakoleoptilen, die innerhalb der nächsten 40 Minuten bis auf über 20 % gesteigert wurde, was auf eine entkoppelnde Wirkung als Nebeneffekt lipophiler Hemmstoffe schliessen lässt.
Eine eingeschobene anaerobe Phase ließ nach Sauerstoffzufuhr die CO_2-Abgabe nur noch auf 80 % der Kontrolle ansteigen. Erst nach längerer Versuchsdauer war wieder eine weitere Zunahme der CO_2-Abgabe festzustellen (Abb.16).

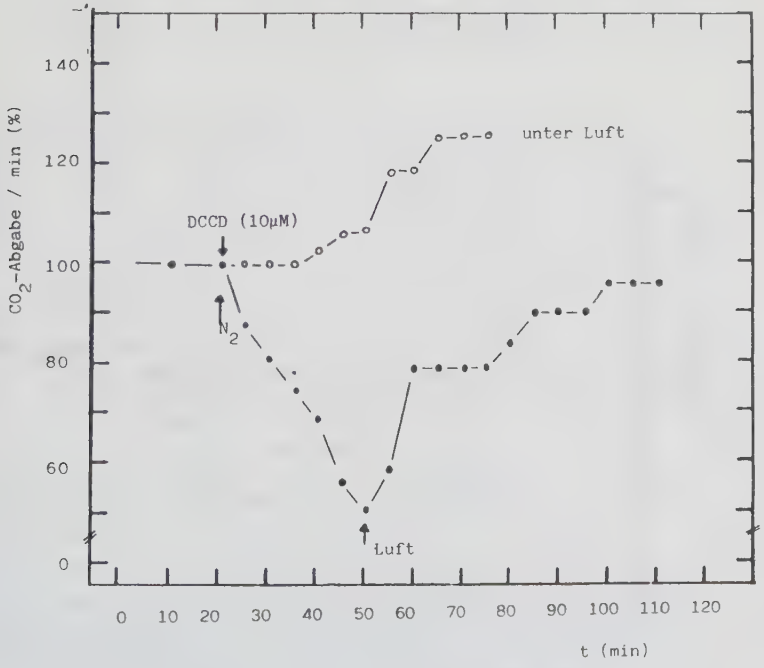


Abb. 16. Der Einfluß von DCCD (Dicyclohexylcarbodiimid, 10 µM) auf die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter aeroben (o) und anäeroben (•) Bedingungen. (Luftkontrolle = 100% = 0,4 µmol CO_2/g FG; 5 mM MES, pH 5.8, 30°C).

3.4.4. Einfluß von Fluoracetat

3.4.4.1. - auf die CO_2-Abgabe

Avenakoleoptilen wurde unter Anaerobiose Fluoracetat (10 mM) appliziert; es trat keine Veränderung in der CO_2-Abgabe ein; daraus ist zu schliessen, daß keine mitochondriale Atmung bei der noch meßbaren CO_2-Abgabe beteiligt ist; das bedeutet auch, daß wirklich anaerobe Verhältnisse vorlagen. Nach anschliessender Sauerstoffgabe stieg die CO_2-Abgabe langsam wieder an und erreichte nach 15 Minuten einen Maximalwert von 85 % der Kontrolle (Abb.17). Wurde Fluoracetat in derselben Konzentration unter Luftbedingungen gegeben, fiel die CO_2-Abgabe nach einer lag-Phase von 10 Minuten innerhalb der nächsten 30 Minuten um annähernd 20 % ab (Abb.18).

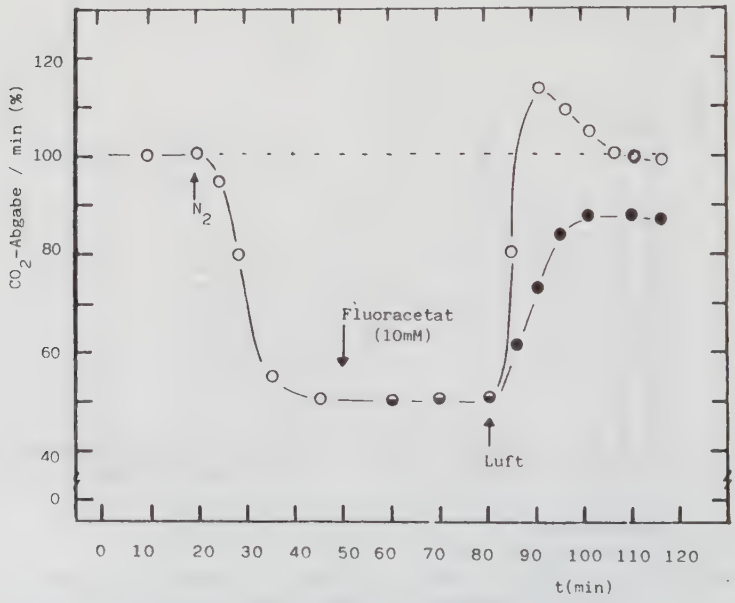


Abb. 17. Die Wirkung von Fluoracetat (10 mM) auf die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter anaeroben und postanaeroben Bedingungen in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C. (Luftkontrolle = 100 % ≙ 0,4 µmol CO_2/g FG).

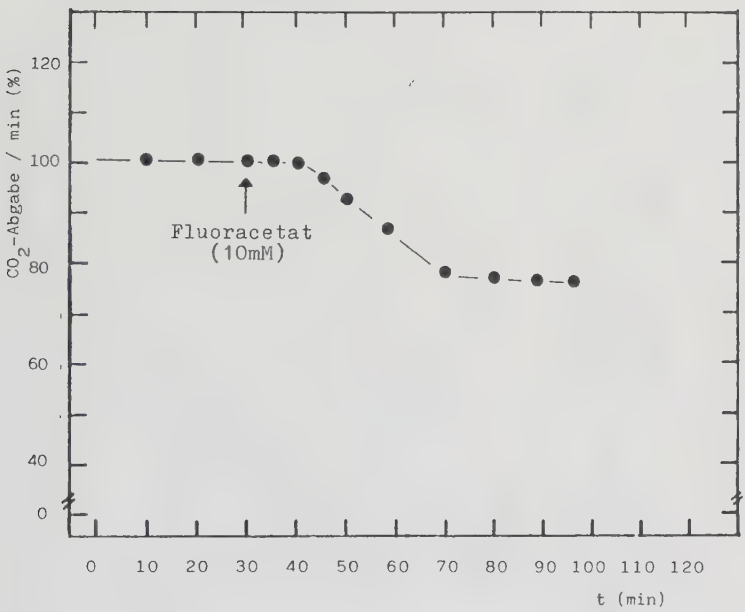


Abb. 18. Der Einfluß von Fluoracetat (10 mM) auf die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen unter aeroben Bedingungen in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C. (Kontrolle = 100 % ≙ 0,4 µmol CO_2/gFG)

3.4.4.2. - auf das Wachstum von Avenakoleoptilen

Die Zugabe von Fluoracetat (10 mM) zu Koleoptilsegmenten gleichzeitig mit Beginn der anaeroben Phase (Abb.19), ließ den postanaeroben Wachstumsburst praktisch unverändert auftreten. Nach 30 Minuten war eine leichte Wachstumssteigerung gegenüber den nicht mit Fluoracetat behandelten Koleoptilen festzustellen.
Lässt man Fluoracetat unter aeroben Bedingungen auf Avenakoleoptilsegmente einwirken, so tritt 25 -30 Minuten nach Zugabe eine leichte Wachstumssteigerung ein (Abb.20).

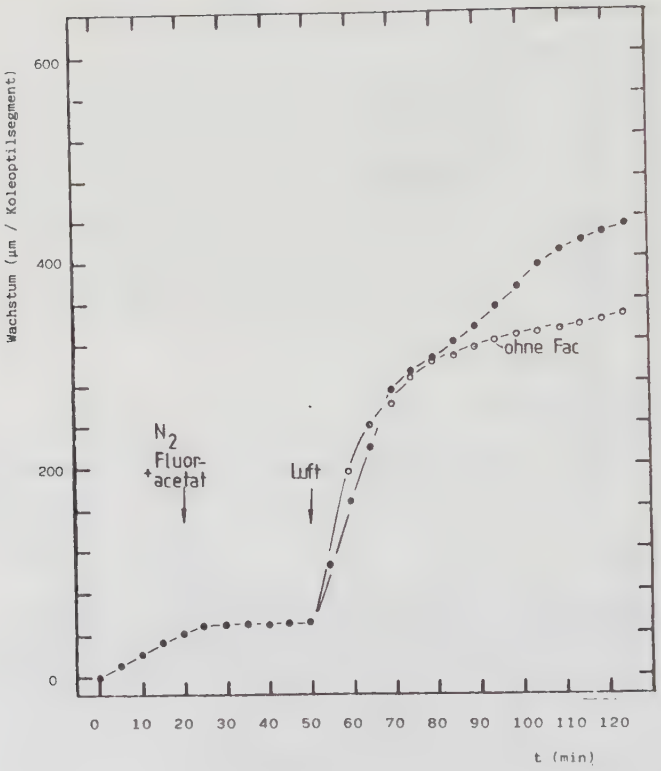


Abb. 19. Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt von Avenakoleoptilsegmenten unter dem Einfluß von Fluoracetat (10 mM) in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.

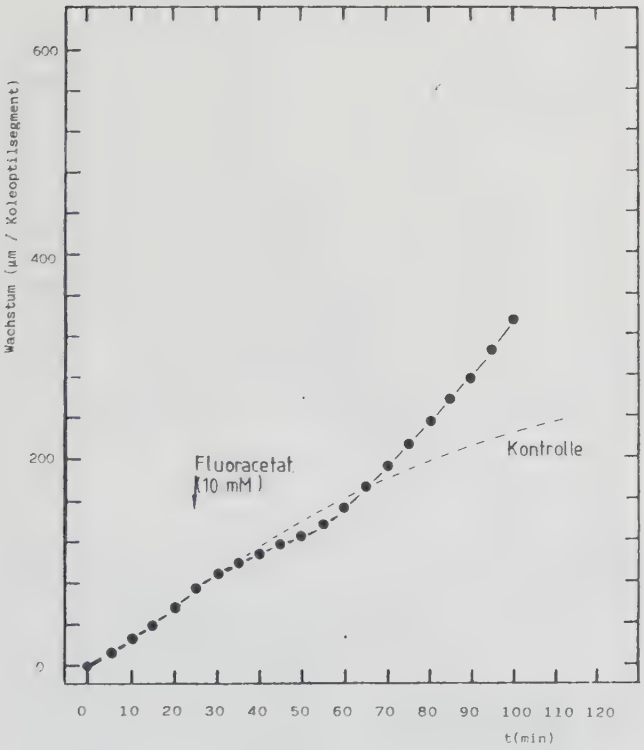


Abb. 20. Wirkung von Fluoracetat (10 mM) auf das Wachstum von Avenakoleoptilen. (5 mM MES, pH 5.8, 30°C)

Eine Wachstumszunahme konnte auch ausglöst werden, wenn Fluoracetat nach 30-minütiger Einwirkungszeit wieder ausgewaschen und gegen reinen MES-Puffer (5 mM, pH 5.8) ausgetauscht wurde (Abb.21). Dabei war festzustellen, daß die Wachstumssteigerung ähnlich wie beim ANA-Effekt verlief.

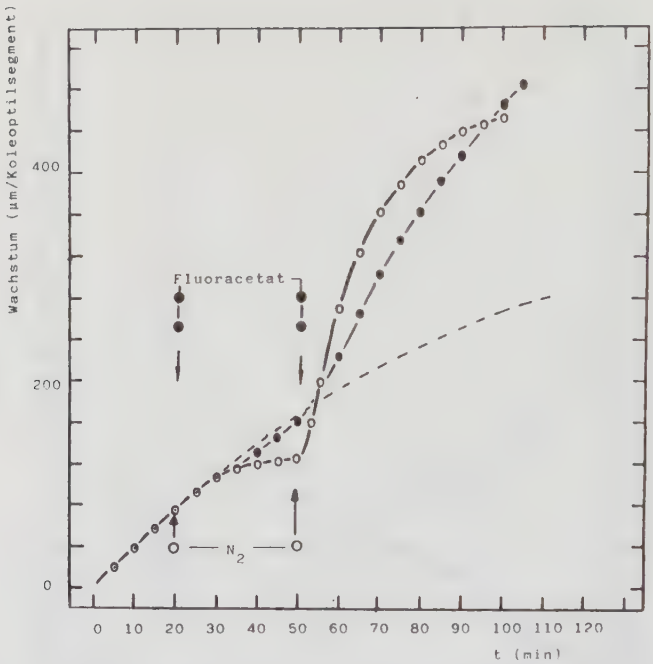


Abb. 21. Einfluß von Fluoracetat (10 mM) auf das Wachstum von Avenakoleoptilen.
● - 30-minütige Einwirkung von Fluoracetat unter Luft, anschliessend Überführung in reinen MES-Puffer (5 mM, pH 5.8, 30°C)
o - ANA-Effekt in MES-Puffer
--- Luftkontrolle in "

3.5. Die Beziehung zwischen Lactatbildung und ANA-Effekt bei Avenakoleoptilen
Der Einfluß von Fluorid

Untersuchungen (Hager, 1980) haben ergeben, daß Avenakoleoptilen unter Anaerobiose Milchsäure bilden, welche zu einer Ansäuerung des Cytoplasmas führen könnte und so in der anschliessenden aeroben Phase mit zur Aktivitätssteigerung der für das Wachstum postulierten ATPase beitragen könnte.
Die Bedeutung der Lactatbildung für den ANA-Effekt beim Wachstum sollte in den anschliessenden Versuchen untersucht werden: Wie wirkt sich eine Hemmung der Lactatbildung unter anaeroben Bedingungen auf den anschliessenden Wachstums"burst" aus?
Als Hemmstoff der Lactatbildung wurde Na-Fluorid verwendet, das in die Glykolyse beim Enzym Enolase eingreift und eine Aktivitätsverminderungdesselben bewirkt (Miller, 1958; Ross et al., 1962).

3.5.1. - auf die CO_2-Abgabe

Fluorid (5 mM) wurde Avenakoleoptilen 30 Minuten nach Anaerobiosebeginn zugegeben (Abb.22). Die CO_2-Abgabe, die auf 50 % abgesunken war, wurde durch Fluorid innerhalb von 20 Minuten nochmals um 20 % vermindert. Nach anschliessender Sauerstoffzufuhr, noch unter Fluorideinwirkung, stieg die CO_2-Abgabe wieder an und erreichte nach 30 min annähernd den Wert der Kontrollen ohne Fluoridbehandlung. Es fehlte jedoch dabei der typische CO_2-Peak, der sonst über die Kontrolle hinausragte.
Erfolgte die Zugabe von Fluorid mit Beginn der Anaerobiose (Abb.23), so lag der Wert für die CO_2-Abgabe nach 30 Minuten unter dem der unbehandelten Koleoptilen. Wurde das Fluorid mit Beginn der Sauerstoffzufuhr ausgewaschen und gegen reinen MES-Puffer (5 mM, pH 5.8, 30°C) ausgetauscht, nahm die CO_2-Abgabe schnell wieder zu und erreichte innerhalb 10 Minuten ein Maximum bei 80 %, wobei festzustellen war, daß der CO_2-Peak wieder fehlte.
Im Vergleich mit Koleoptilen, die in der postanaeroben Phase noch unter Fluorideinwirkung standen (Abb. 22), konnte man feststellen,

daß Koleoptilen ohne Fluorid in dieser Phase schneller wieder einen Maximalwert der CO_2-Abgabe erreichten.

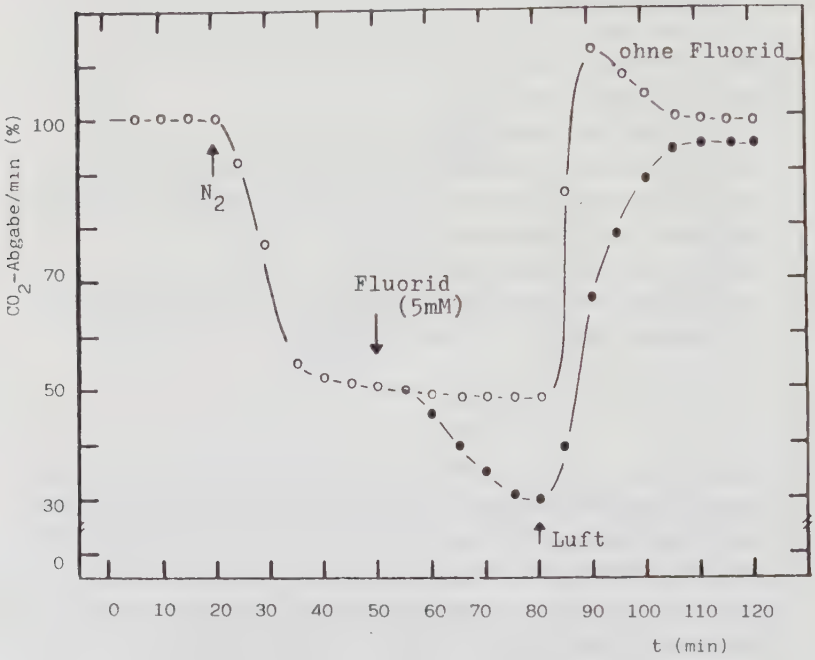


Abb. 22. Einfluß von Fluorid (5 mM) auf die CO_2-Abgabe bei Avena-koleoptilen während und nach einer anaeroben Phase in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C. (Luftkontrolle = 100 % ≙ 0,4 µmol CO_2/gFG)

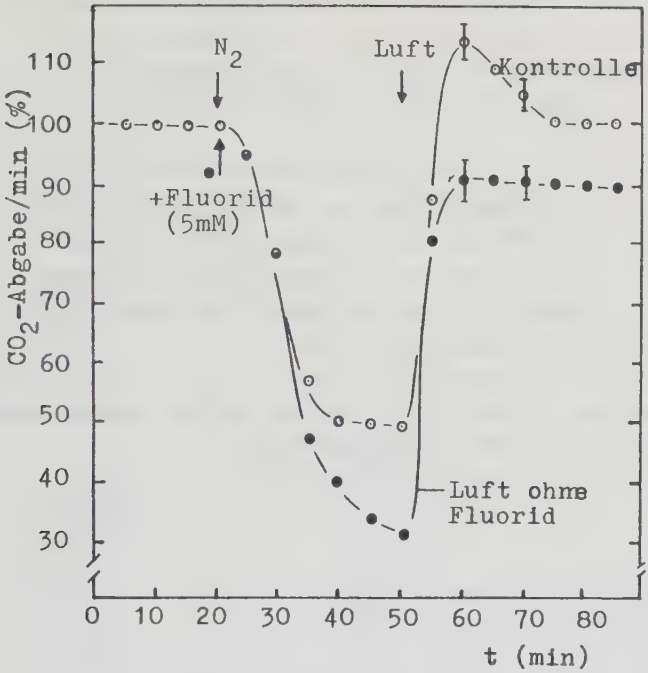


Abb. 23. CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen nach anaerober Inkubation mit Fluorid (5 mM).
Bei Luftgabe wurde gegen reinen MES-Puffer ausgetauscht. (5 mM MES, pH 5.8, 30°C; Luftkontrolle = 100 % ≙ 0,4 µmol CO_2/ g FG)

3.5.2. - auf den ANA-Effekt beim Wachstum

Avenakoleoptilen wurde mit Beginn der anaeroben Behandlung Fluorid (5 mM) appliziert (Abb.24). Die Wachstumsrate nahm dabei stärker ab als bei den unbehandelten Koleoptilen (Abb. 25). Wurde nach 30 min Anaerobiose wieder Luft gegeben und das Fluorid ausgewaschen, um einen inhibitorischen Einfluß auf das Stoffwechselgeschehen auszuschliessen, dann stieg die Wachstumsrate innerhalb von 10 Minuten

auf 7 µm / min x Segment an, was nur etwa der Hälfte der sonst üblichen Steigerung beim ANA-Effekt entsprach . Nach 35 Minuten war die Wachstumsgeschwindigkeit der nicht mit Fluorid behandelten Koleoptilen und der der Luftkontrollen (ohne anaerobe Phase) zu dieser Zeit wieder erreicht.

Betrachtet man den Zuwachs der Koleoptilen unter den obigen Bedingungen nach 80 Minuten Versuchdauer, dann war ersichtlich, daß die mit Fluorid behandelten Koleoptilen zu diese Zeit denselben Zuwachs von 228 µm/Segm. aufwiesen wie die Luftkontrollen zu dieser Zeit. Die nur anaerob, nicht mit Fluorid behandelten Koleoptilen zeigten einen annähernd doppelt so starken Zuwachs von 410 µm/Segment.

Fluoridbehandelte Koleoptilen holten also in der postanaeroben Phase nur das Wachstum bis zur Luftkontrolle auf, ohne das "Überschiessen" wie beim üblichen Wachstums"burst" aufzuweisen.

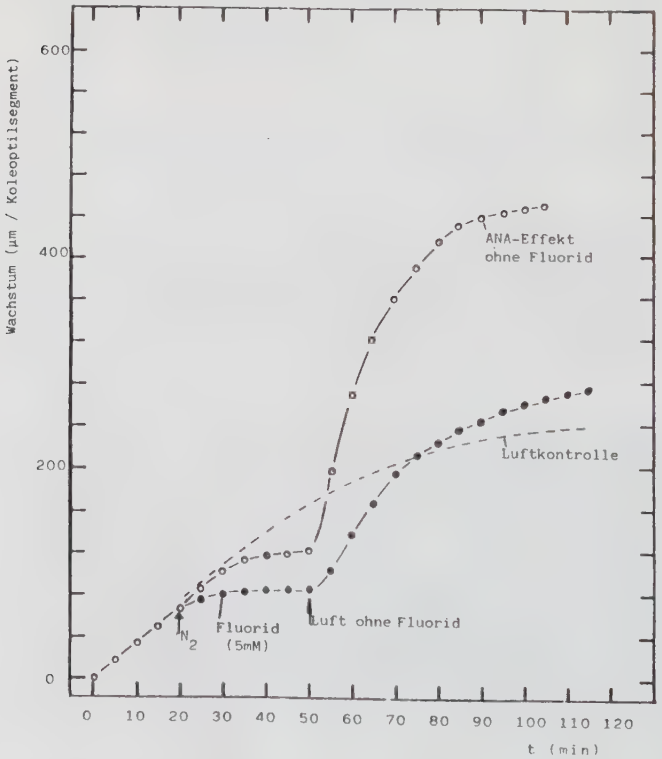


Abb.24. Wirkung von Fluorid (5 mM) auf den ANA-Effekt beim Wachstum. Bei Luftzugabe wurde gegen reinen MES-Puffer (5 mM, pH 5.8, 30°C) ausgetauscht.

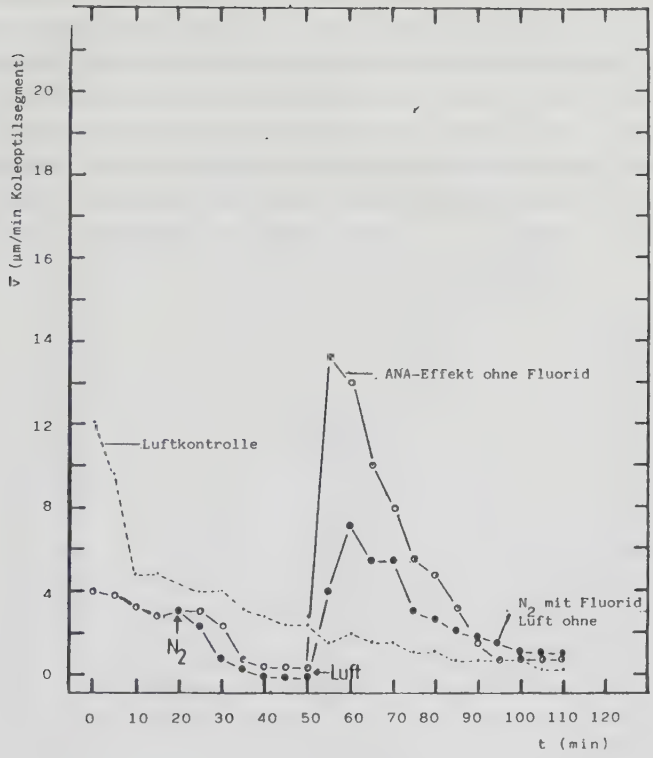


Abb. 25. Wachstumsrate 1 cm langer Avenakoleoptil-segmente in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.
● - Fluorideinwirkung unter Anaerobiose, bei Luftgabe Wechsel des Mediums gegen reinen MES-Puffer
o - ohne Fluorid (5 mM)

3.5.3. - auf das Wachstum unter Luft

Inkubierte man Avenakoleoptilsegmente unter aeroben Verhältnissen 30 Minuten mit Fluorid (5 mM), trat eine Hemmung des Wachstums ein. Tauschte man anschliessend das Fluorid-haltige Medium gegen reinen MES-Puffer (5 mM, pH 5.8, 30°C) aus, erfolgte eine Zunahme des Wachstums im selben Maß wie bei Koleoptilen, die unter Anaerobiose mit Fluorid behandelt wurden. Auch hier war festzustellen, daß das Wachstum nur wieder bis zu Kontrolle ohne Fluoridbehandlung aufgeholt wurde. (Abb.26).

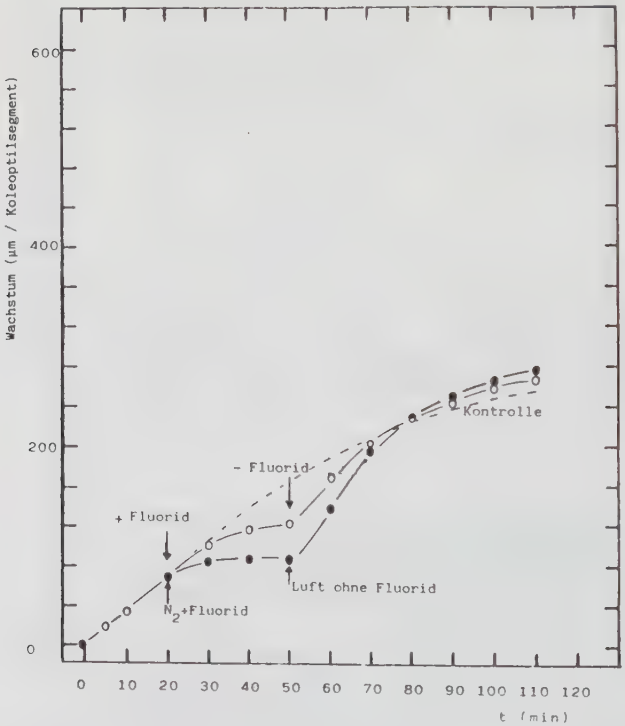


Abb. 26. Einfluß von Fluorid auf den Wachstumsverlauf von Avenakoleoptilen unter aeroben (o) und anaeroben (•) Bedingungen.
(5 mM MES, pH 5.8, 30°C)(Fluorid, 5 mM)

3.5.4. - auf die Lactatbildung unter Anaerobiose

Bei Avenakoleoptilsegmenten wurde unter denselben Versuchsbedingungen wie bei den Wachstumsversuchen der Lactatgehalt bestimmt (Abb.27). Sie enthielten schon unter Luft eine geringe Menge an Lactat (0,26µmol/gFG). Nach einer 30-minütigen anaeroben Phase war eine Zunahme auf beinahe das 10-fache zu messen (2,2 µmol/g FG).
Wurde nun mit Beginn der Anaerobiose Fluorid (5 mM) gegeben, war nach 30 Minuten keine Zunahme des Lactats mehr zu messen. Der Wert lag im Bereich der Luftkontrolle zu dieser Zeit.

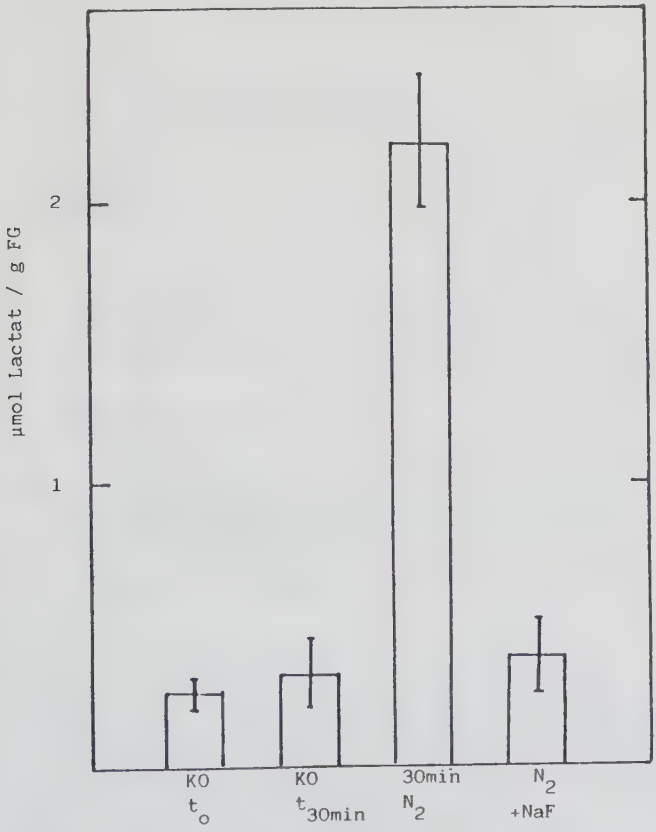


Abb.27. Der Einfluß von Na-Fluorid (NaF, 5 mM) auf die Lactatbildung unter Anaerobiose (N_2) bei Avenakoleoptilen in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.
KO_{t_0} - Kontrolle zu Versuchsbeginn, $KO_{t_{30min}}$ - nach 30 Minuten Luft.

3.6. Wirkung von 2-Naphtylacetat auf das Wachstum von Avenakoleoptilen

Aus Versuchen in 3.5. war ersichtlich, daß eine Ansäuerung im Innern der Zellen von Avenakoleoptilen eine maßgebliche Ursache des ANA-Effektes zu sein scheint.
Es sollte nun untersucht werden, ob Substanzen, die eine intrazelluläre Ansäuerung bewirken könnten, ebenfalls eine Wachstumssteigerung auslösen. Nach Vesper und Evans (1979) soll 2-Naphtylacetat in diesem Sinne wirken. Es soll schnell aufgenommen und zu Naphtol und Essigsäure hydrolysiert werden. Die Essigsäure könnte in diesem Falle als endogene H^+-Quelle fungieren.

Avenakoleoptilen wurden unter aeroben Bedingungen mit 2-Naphtylacetat (2-NA, 100 µM) inkubiert. Schon nach 5 Minuten konnte eine Zunahme des Wachstums festgestellt werden (Abb. 28). Wurde 2-NA unter Anaerobiose gegeben (Abb. 29), konnte keine Veränderung in der geringen Wachstumsrate festgestellt werden. Nach anschliessender Luftzufuhr stieg die Wachstumsrate sehr schnell wieder an. Der Zuwachs hielt aber länger an und übertraf nach 100 Minuten in der Endlänge die nicht mit 2-NA behandelten Koleoptilen um über das Doppelte. Der Zuwachs beim normalen ANA-Effekt wurde mit 2-Naphtylacetat im Medium weit übertroffen.
Es erhob sich nun die Frage, ob 2-NA unter Anaerobiose aufgenommen wird und eine innere Ansäuerung bewirkt, die nur nicht in einer Wachstumssteigerung zum Tragen kommt, weil die energetischen Voraussetzungen fehlen oder ob auch keine Aufnahme stattfindet und erst unter aeroben Bedingungen der Prozess in Gang gesetzt wird und so eine sofortige Wachstumssteigerung eintritt, die über dem ANA-Effekt liegt.
Dazu wurde 2-NA unter Anaerobiose appliziert, vor der anschliessenden Sauerstoffzufuhr aber wieder sorgfältig ausgewaschen und gegen reinen MES-Puffer ausgetauscht (Abb. 29). Der Wachstums"burst" trat sofort ein und war gegenüber den nicht mit 2-NA behandelten Koleoptilen deutlich verstärkt. Die Endlänge der Koleoptilen, die unter Anaerobiose unter 2-NA-Einfluß standen, war nach 100 Minuten Versuchsdauer um 53 % (160 µm) grösser als die der Kontrollen beim ANA-Effekt.

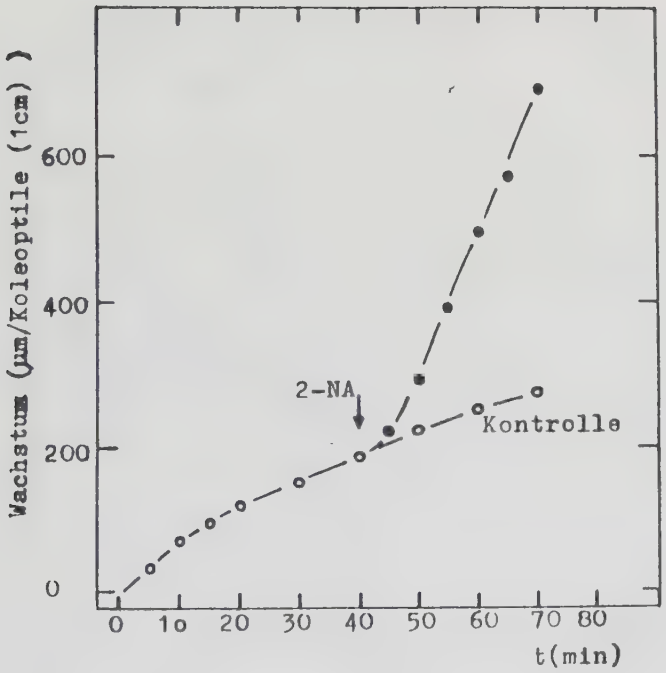


Abb. 28. Wirkung von 2-Naphtylacetat (2-NA, 100 µM) auf das Wachstum von Avenakoleoptilen in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.

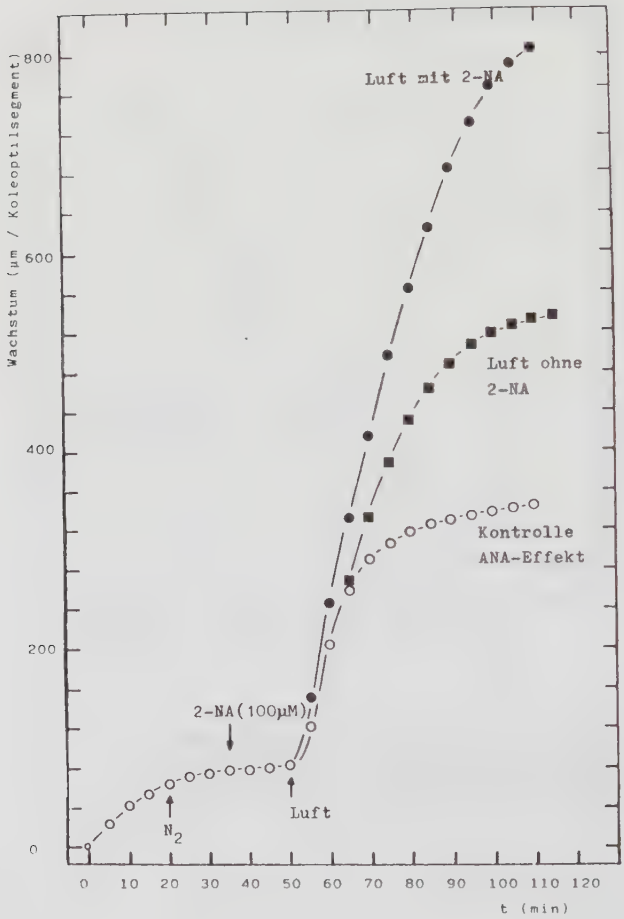


Abb. 29. Einfluß von 2-Naphtylacetat (2-NA, 100 µM) auf den Wachstumsverlauf beim ANA-Effekt von Avena-koleoptilsegmenten in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.

3.7. Einfluß von 2-Naphtylacetat und Fluoracetat auf den pH-Wert bei Avenakoleoptilen

In folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die beobachteten Wachstumssteigerungen durch Fluoracetat (3.4.4.) und 2-Naphtylacetat (3.6.) mit einer Änderung des pH-Wertes im Zellsaft einhergehen.

Dazu wurde nach einer Inkubationszeit von 15- und 30 Minuten mit den beiden Substanzen in 5 mM MES (pH 5.8, 30°C) der pH-Wert des Gewebepressaftes bestimmt. 2-NA (100 µM) bewirkte nach 15 Minuten eine pH-Abnahme von 6.26 der Kontrolle auf 6.11; nach weiteren 15 min war der pH-Wert auf 6.07 abgesunken. Unter dem Einfluß von 2-NA trat also eine pH-Änderung um 0.19 Einheiten ein.

Durch Fluoracetat konnte im selben Zeitraum nach 15 Minuten eine pH-Abnahme auf 6.17 und nach weiteren 15 Minuten auf 6.14 gemessen werden (Abb. 30).

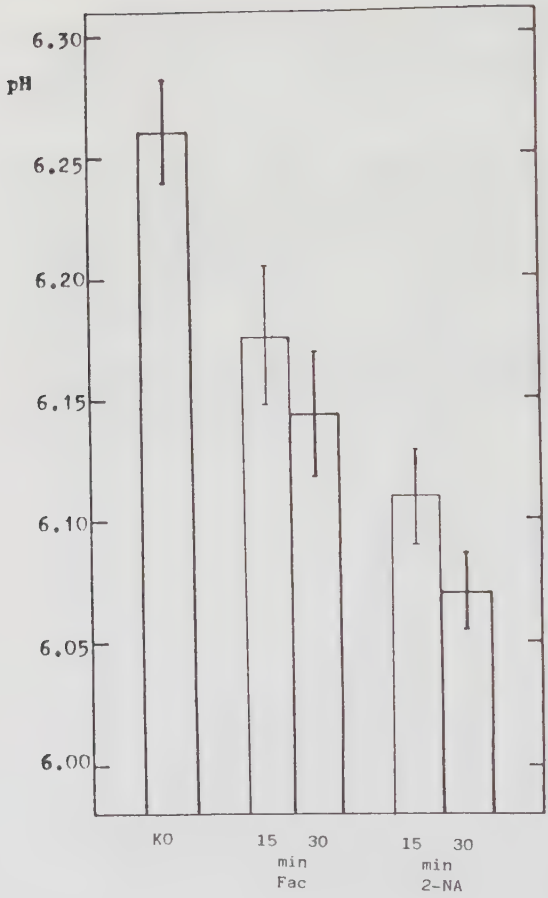


Abb. 30. Einfluß von Fluoracetat (Fac, 10 mM) und 2-Naphtylacetat (2-NA,100 µM) auf den pH-Wert des Zellsaftes von Avena-koleoptilen.
(5 mM MES, pH 5.8, 30°C)

3.8. Untersuchungen zum ANA-Effekt mit Koleoptilen von Zea mays

3.8.1. Einfluß anaerober Bedingungen auf das Wachstum

Bei 1 cm langen Maiskoleoptilsegmenten wurde unter denselben Bedingungen wie bei Haferkoleoptilen das Wachstum gemessen (Abb.31). Nach einer 30-minütigen anaeroben Phase wurde wieder Luft gegeben. Das Wachstum begann langsam wieder anzusteigen und erreichte nach 30 Minuten das der Luftkontrolle zu dieser Zeit.
Ein "Überschiessen", bzw. ein Wachstums"burst", wie er bei Avenakoleoptilen eintritt, konnte nicht festgestellt werden. Die Endlänge der anaerob behandelten Koleoptilen übertraf nicht die der Luftkontrollen.

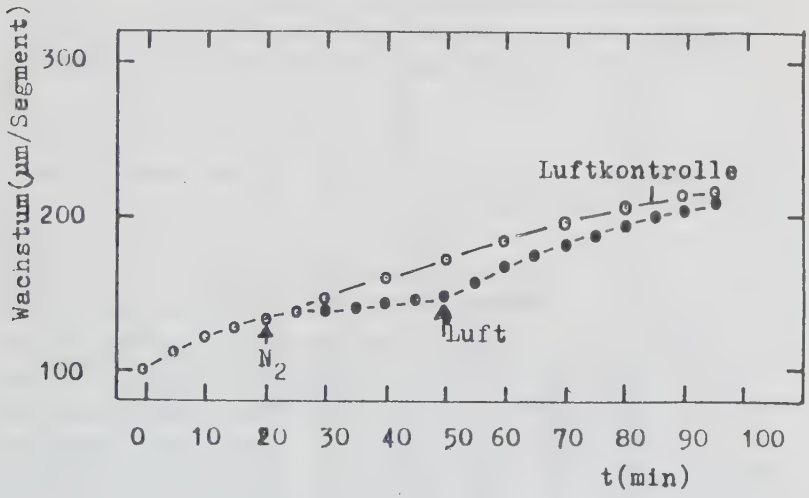


Abb. 31. Verlauf des Wachstums von 1 cm langen Maiskoleoptilen während und nach eingeschobener Anaerobiose in MES-Puffer (5 mM, pH 5.8, 30°C).

3.8.2. Lactatbildung unter Anaerobiose

Um zu testen, ob der Unterschied des postanaeroben Wachstums bei Mais im Vergleich zu Hafer auf Unterschiede in der Lactatbildung unter Anaerobiose zurückgeführt werden könnte, wurde der Lactatgehalt in Maiskoleoptilen nach 30 Minuten anaerober Inkubation gemessen (Abb.32).
Die Zunahme an Lactat betrug gegenüber der Luftkontrolle das 2 1/2-fache. Vergleicht man damit die Zunahme bei Avenakoleoptilen, dann kann man dort eine annähernd 10-fache Zunahme messen.

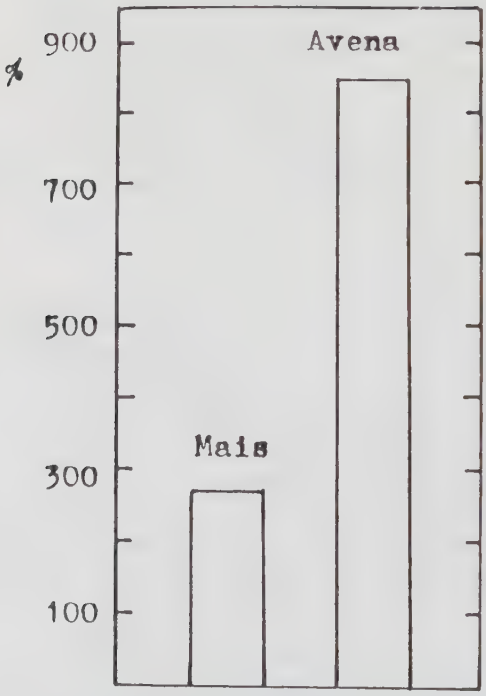


Abb.32. Zunahme des Lactatgehalts nach 30 min Anaerobiose bei Zea mays- und Avenakoleoptilen in 5 mM MES, pH 5.8, 30°C.

4. Diskussion

Avenakoleoptilen zeigen nach zeitlich begrenzter, anaerober Inkubation nach anschliessender Sauerstoffzufuhr für 20 - 30 Minuten eine Art Superwachstum, welches auch als ANA-Effekt (Anaerobiose-Aerobiose-Übergangseffekt) bezeichnet wird (Krauss und Hager, 1976).
Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob die molekularen Ursachen dieses Superwachstums auf Änderungen im Stoffwechselgeschehen unter Anaerobiose zurückgeführt werden können.
Das meiste, was über den anaeroben Stoffwechsel bei Pflanzen bekannt ist, resultiert aus Studien mit Pflanzenwurzeln und erfolgte im Zusammenhang mit der Überflutungstoleranz bei Pflanzen (Crawford, 1968, 1978, 1982; Smith und ap Rees, 1979, a, b; Saglio et al.,1980).

Aus Untersuchungen zum ANA-Effekt beim Wachstum von Avenakoleoptilsegmenten ist bekannt, daß diese ihren Stoffwechsel auf anaerobe Bedingungen einstellen (Hager, 1980). Es konnte anhand der Lactatakkumulation auf eine Milchsäuregärung geschlossen werden. Ebenso konnte die durch den Gärungsstoffwechsel bedingte verminderte Energieproduktion unter Anaerobiose anhand des abnehmenden ATP-Spiegels gezeigt werden.
In diesem Zusammenhang lag es nahe, nach weiteren Änderungen im Stoffwechselgeschehen bei Avenakoleoptilen unter Anaerobiose zu suchen. Dazu bot sich die Untersuchung des Gaswechsels an, der Hinweise über die Art der Fermentation geben könnte.
Es konnte gezeigt werden, daß Avenakoleoptilen unter Anaerobiose ihre CO_2-Produktion nur auf die Hälfte verringern (Abb.4); daraus kann geschlossen werden, daß nicht nur eine reine Milchsäuregärung stattfindet, sondern auch auf Äthanolproduktion umgeschaltet wird; Äthanolbestimmungen (3.3.1.) haben dies auch bestätigt.
Korreliert man die CO_2-Bildung unter anaeroben Verhältnissen mit der Äthanolakkumulation im selben Zeitraum, so kann man feststellen, daß diese nicht in demselben Verhältnis zueinander stehen wie bei der alkoholischen Gärung, nämlich 1:1 (CO_2:Äthanol), sondern im Verhältnis 3:1 (s. 3.3.1 und 3.2.).

Effer und Ranson (1967a) schlossen aus solchen erhöhten CO_2-Werten unter Anaerobiose, daß noch andere "Extra-CO_2" liefernde Reaktionen unter Sauerstoffabschluß stattfinden, wie z.B. die Decarboxylierung von organischen Säuren.

Girton (1979) schloss aus Berechnungen des F/R-Quotienten (CO_2-Abgabe unter N_2 zu CO_2-Abgabe unter Luft) bei Reiskoleoptilen mit einem Wert von 0,6, daß diese die Fähigkeit besitzen auf Fermentationsprozesse umzuschalten. Einen in diesem Bereich liegenden Wert kann man auch für Avenakoleoptilen berechnen. Es sollte jedoch Vorsicht geboten sein, die CO_2-Abgabe allein als Interpretationsmöglichkeit für den Gärungsstoffwechsel heranzuziehen. Es verleitet z.B. aus einer im Vergleich zur reinen alkoholischen Gärung erhöhten CO_2-Abgabe unter Anaerobiose auf eine erhöhte Glykolyseaktivität und damit gesteigerten Glucoseumsatz zu schliessen. Effer und Ranson (1967) versuchten den Glucoseumsatz unter Anaerobiose anhand der Summe des gebildeten Äthanols, Lactats und CO_2's zu bestimmen und gingen davon aus, daß unter Luft alle Glucose zu CO_2 abgebaut wird.

Vergleichsweise aufgestellte Berechnungen ergeben im Falle von Avenakoleoptilen unter aeroben und anaeroben Bedingungen einen annähernd gleichen Glucoseumsatz. Die gebildete CO_2-Menge unter Luft beträgt nach 1 Stunde ca. 24 µmol/g FG und die Summe des gebildeten CO_2's, Lactats und Äthanols ca. 22 µmol/ g FG.

Die Ergebnisse der CO_2-Messungen (3.2) und die zum Teil kontroversen Meinungen über die Bedeutung des Äthanols bei der Anaerobiosetoleranz von Pflanzen (s.u.), legte die Bestimmung des Äthanolgehalts in Avenakoleoptilen nahe (3.3.1.).

Es wird behauptet (z.B. Crawford, 1967; McManmon und Crawford, 1971), daß intolerante Pflanzen eine grosse Menge Äthanol auf Grund der zunehmenden ADH-Aktivität unter Anaerobiose bilden. Tolerante Pflanzen würden nicht mit Äthanolproduktion reagieren, sondern Malat produzieren, welches bei intoleranten Pflanzen abnimmt und über Pyruvat zusätzlich zu Äthanol umgebildet wird. Auch andere Autoren sind der Meinung, daß die Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber Anaerobiose aus der erhöhten Produktion von Äthanol resultiert (Pradet und Bomsel, 1978; Chirkova, 1978). Smith und ap Rees (1979) stimmen nicht mit

Crawford's Theorie der Überflutungstoleranz überein. Sie konnten sowohl in intoleranten als auch in toleranten Pflanzen unter Anaerobiose eine Äthanolakkumulation feststellen und keine Unterschiede in der ADH-Aktivität messen.

Inzwischen erschienen zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Bedeutung bzw. Toxizität von Äthanol für Pflanzen beschäftigen. Dabei wurde besonders berücksichtigt, welche Äthanolkonzentrationen toleriert werden und ob Äthanol in der Pflanze akkumuliert oder abgegeben wird (s. Jackson et al., 1982).

Erwähnenswert ist, daß viele solche Untersuchungen an, nach Crawfords Anschauung nicht äthanolbildenden Objekten, wie z.B. Reiskeimlingen, gemacht wurden. So konnte bei diesen während einer 48-stündigen anaeroben Phase eine kontinuierliche alkoholische Gärung beobachtet werden, wobei der überwiegende Anteil an Äthanol im Außenmedium gefunden wurde (Bertani et al., 1980). Diese Autoren vertreten die Meinung, daß die Abgabe von Äthanol ans Außenmedium ab einem kritischen Punkt, der Pflanze die Fähigkeit gibt, Anaerobiose zu überstehen.

Bei Erbsenkeimlingen wurden intrazelluläre Äthanolkonzentrationen bis 60 mM gefunden und als Grenzwert für Überflutungsschädigungen betrachtet (Barclay und Crawford, 1981).

Rumpho und Kennedy (1983) fanden in Samen von Echinochloa grus-galli, einem Unkraut in Reisfeldern, nach 7 Tagen Überflutung eine Äthanolkonzentration von 11 mM. Sie konnten auch feststellen, daß exogen appliziertes Äthanol in Konzentrationen bis zu 515 mM keine lethalen Wirkungen auf keimende Samen hatte, auch wenn die Keimung und das Wachstum gehemmt wurden.

Bei sehr hohen Äthanolkonzentrationen (1100 mM) zeigte sich bei Winterweizenkeimlingen eine Änderung in der Ionenpermeabilität (Andrews und Pomeroy, 1979). Dieselben Autoren konnten jedoch auch feststellen, daß ein leichter anaerober Stress unter niederen Temperaturen für diese Pflanzen eine Akklimatisierung an Frostzustände ermöglicht (1983).

Avenakoleoptilen zeigten nach 1-stündiger Anaerobiose eine deutliche Äthanolbildung (Abb.6). Der zelluläre Gehalt beträgt 3.1 µmol/g FG, was einer Konzentration von ca. 6 mM entspräche, wenn man die Ausbeute an Gewebepressaft von 0,5 ml (2.10) als Berechnungsgrundlage heranzieht. In der Außenlösung (10 ml) konnte eine Konzentration von 13,7 µM gemessen werden.
Diese Äthanolkonzentrationen bewirkten in Avenakoleoptilen keine Schädigungen, was aus dem anschliessend unter aeroben Bedingungen sofort eintretenden Wachstums"burst" zu schliessen ist.
Ähnliche Werte wurden für Haferkoleoptilen unter Anaerobiose von Alpi und Beevers (1983) gefunden. Sie führten u.a. Untersuchungen zum Wachstum von Reis- und Haferkoleoptilen unter Sauerstoffausschluß durch und konnten das schon bekannte Wachstum bei Reis unter Anaerobiose(Öpik,1973) beschreiben, wohingegen bei Hafer kein Wachstum mehr festzustellen war. Bei der Bestimmung des Äthanols, als mögliche Ursache des Unterschieds, konnten sie in Reis- und Haferkoleoptilen annähernd die selbe Menge an Äthanol messen. Daraus schlossen sie, daß die Fähigkeit der Reiskoleoptilen, unter Anaerobiose zu wachsen, scheinbar nicht durch eine besonders geringe Äthanolbildung oder durch ungewöhnliche -Toleranz bedingt ist.
Solche Hinweise zeigen, daß die Adaptionsmechanismen der Pflanzen für eine Überflutungstoleranz nicht gleich sein können. Es muß angenommen werden, daß verschiedene Fermentationsprodukte dabei von Bedeutung sein können (Smith und ap Rees, 1979).

In diesem Hinblick war von Interesse, ob weitere Änderungen im anaeroben Stoffwechsel bei Avenakoleoptilen eintreten.
Man weiß, daß bei Pflanzen unter Anaerobiose auch Lactat gebildet wird (Barker und El Saifi, 1953; Wager, 1961; Effer und Ranson,1967; Sherwin und Simon, 1969; Leblová et al.,1974; Hager, 1980; u.a.). Außerdem wird von anderen Akkumulationsprodukten wie z.B. Alanin (Effer und Ranson, 1967; Smith und ap Rees, 1979) und γ-Aminobuttersäure (Streeter und Thompson, 1972) berichtet.
Diese Befunde und die schon erwähnte erhöhte CO_2-Abgabe unter Anaerobiose, die eventuell aus zusätzlichen Decarboxylierungen resultieren könnte, legte die Bestimmung der freien Aminosäuren in Avenakoleoptilen nahe.

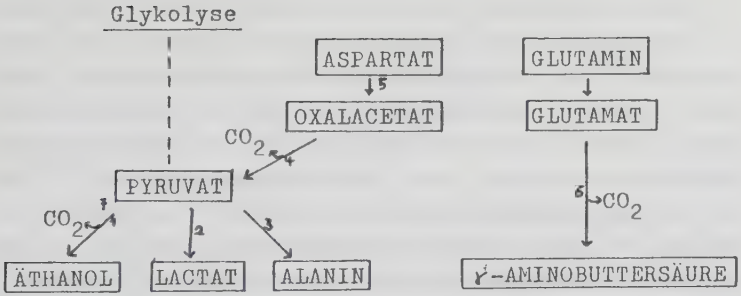
Nach 1-stündiger Anaerobiose nimmt der Gehalt an Asparaginsäure(ASP), Glutaminsäure (GLU) und Glutamin (GLN) ab, der von Alanin (ALA) und γ-Aminobuttersaäure (GABA) zu (Abb.8).
Über vergleichbare Ergebnisse wird in der Literatur berichtet (Effer und Ranson, 1967; Streeter und Thompson,1972; Smith und ap Rees, 1979). Bei Phaseolus konnte im frühen Keimungsstadium, das einem Anaerobiosezustand gleichkommt, eine Zunahme des ALA-Gehalts gemessen werden (Mohorashi, 1978). In welkenden Blättern von Brassica wird eine Zunahme des ALA- und GABA-Gehalts auf den durch Stomataschluß bedingten Sauerstoffmangel zurückgeführt (Thompson et al.,1966). In Reiskeimlingen erfolgt unter Anaerobiose ebenfalls eine Zunahme bestimmter freier Aminosäuren, besonders von Alanin (Bertani und Brambilla, 1982).

Betrachtet man den Stoffwechsel der Aminosäuren, so kann man feststellen, daß die Zunahme an GABA von der entsprechenden Abnahme an GLN und GLU begleitet ist. Eine Glutamatdecarboxylierung und eine Desaminierung von Glutamin könnte dies erklären. Das verantwortliche Enzym, die Glutamat-Decarboxylase konnte in Pflanzen nachgewiesen werden (Dixon und Fowden, 1961; Inatomi und Slaughter, 1971, 1975; Streeter und Thompson, 1972). Das Produkt dieser Reaktion, γ-Aminobuttersäure, akkumuliert bevorzugt unter ungünstigen Wachstumsbedingungen (Inatomi und Slaughter, 1971). Naylor und Tolbert (1956) fanden im Cytoplasma von Gerstenblättern eine Glutamat-Decarboxylase und stellten fest, daß die Bildung von GABA aus GLU unter anaeroben Bedingungen begünstigt ist. Die Bildung von GABA soll durch Aufhören der Proteinsynthese unter Anaerobiose bedingt sein und scheint eine geschützte Succinatform zu sein, die keinen Einfluß auf den pH-Wert der Zelle hat (Zembianukhin und Ivanov, 1978).
Streeter und Thompson (1972) konnten eine Aktivitätszunahme der Glutamat-Decarboxylase und der Oxalacetat-Decarboxylase aufgrund der pH-Abnahme unter Anaerobiose feststellen. Die Zunahme an Alanin wurde u.a. auf die Tätigkeit der Oxalacetat-Decarboxylase zurückgeführt. Dabei führt eine Aktivitätssteigerung der ASP-Transaminase zur Bildung von Oxalacetat, das dann durch das genannte Enzym decarboxyliert wird; das entstandene Pyruvat steht dann für die ALA-Transaminase-Reaktion zur Verfügung, was in der Bildung von Alanin resultiert.

Eine Aktivitätssteigerung dieser beiden Transaminasen unter anaeroben Verhältnissen konnte nachgewiesen werden (Werner et al.,1980).
Die Oxalacetatdecarboxylierung unter Anaerobiose ist auch dadurch begünstigt, daß die Bindung an Acetyl-CoA eingeschränkt ist.
Asparaginsäure muß jedoch nicht zu Alanin umgewandelt werden, solange genügend Pyruvat aus der Glykolyse angeliefert wird (Effer und Ranson, 1967; Streeter und Thompson, 1972). So könnte auch die geringere ASP-Abnahme in Bezug auf die ALA-Bildung erklärt werden.
Die erhöhte CO_2-Abgabe unter Anaerobiose könnte ebenfalls auf die Aktivität der oben genannten Enzyme zurückgeführt werden. Der durch Lactatakkumulation bedingte pH-Abfall unter anaeroben Bedingungen (Hager, 1980) bei Avenakoleoptilen begünstigt diese Enzymreaktionen.
Die pH-Optima für Glutamat-Decarboxylase und Oxalacetat-Decarboxylase liegen bei pH 5,9 und pH 5,2 (Streeter und Thompson, 1972).
Eine Aktivierung auf Grund von pH-Änderungen konnte auch von Hager et al., (1969) an einer Thylakoid-gebundenen Deepoxidase durch lichtinduzierte pH-Erniedrigung nachgewiesen werden.
Solche pH-induzierten Enzymaktivierungen könnten auch die Änderungen im Pyridinnucleotidlevel von Avenakoleoptilen erklären (Abb.7).
Nach Überführung unter anaerobe Bedingungen nimmt der NADH-Gehalt in dem Maße zu, wie der NADPH-Gehalt abnimmt (s.a. Hager, 1980), woraus im ersten Moment auf die Tätigkeit einer Transhydrogenase geschlossen werden könnte (Rydström, 1977). Dazu müsste man jedoch die entsprechende Änderung in den oxidierten Formen der Coenzyme annehmen; bei diesen kann aber kein signifikanter Unterschied gegenüber der Luftkontrolle festgestellt werden.
Eine andere Möglichkeit wäre die Tätigkeit einer Phosphatase, die die Reaktion NADPH → NADH + P_i katalysiert. Phosphatasen mit pH-Optimum von 5,9 wurden u.a. in Erbsenblättern gefunden (Forti et al.,1962).
Eine NADPH-Abnahme unter Anaerobiose könnte auch für eine Verringerung des Oxidativen Pentosephosphat-Cyclus sprechen, da kein Bedarf an der Synthese von DNA und RNA zurZellwandsynthese besteht. Es konnte gezeigt werden, daß bei Abnahme des NADPH/NADP-Verhältnisses der OPP abgeschaltet und die Glucose über die Glykolyse verarbeitet wird (Lendzian,1980).
Änderungen im Level der Pyridinnucleotide deuten auf Modifikationen im Kohlenhydratstoffwechsel hin (Yamamoto, 1966).

Damit wären auch die allgemeinen Änderungen im Stoffwechsel von Avenakoleoptilen in Einklang zu bringen.

Anhand der dargelegten Ergebnisse kann man für den Anaerobiosestoffwechsel bei Avenakoleoptilen folgendes Schema aufstellen:



1 - Alkoholdehydrogenase
2 - Lactatdehydrogenase
3 - ALA-Transaminase
4 - Oxalacetatdecarboxylase
5 - ASP-Transaminase
6 - Glutamatdecarboxylase
7 - Pyruvatdecarboxylase

Es stellt sich nun die Frage, welche Änderungen des Stoffwechsels für den Wachstums"burst" in der postanaeroben Phase von maßgeblicher Bedeutung sei könnten.

Es ist zunächst zu erwähnen, daß von Wachstumssteigerungen nach verschiedenen Vorbedingungen berichtet wird. Ray (1961) beobachtete bei Avenakoleoptilen nach Mannitolbehandlung eine Zunahme der Wachstumsrate, die stärker war als vor der Behandlung und so lange andauerte, bis die Länge der unbehandelten Koleoptilen zu dieser Zeit erreicht war. Ray führte für dieses Phänomen den Begriff des "stored-growth" ein und definierte es als Wachstum, das während einer Inhibitorbehandlung aufgespeichert und nach Aufhebung wieder aufgeholt wird.

Cleland und Rayle (1972) folgerten aus ebensolchen Versuchen, daß in dieser Zeit eine Reihe wandlockernder Ereignisse stattgefunden hat, die sich anschliessend in einer "Extrastreckung" auswirken.

In Triticum-Koleoptilen konnte nach Mannitolbehandlung ebenfalls eine Steigerung der Streckungsrate gezeigt werden (Göring et al.,1978).

Bei grünen Erbsenstengelsegmenten wurde nach anaerober Inkubation eine Wachstumssteigerung beobachtet, die mehrere Stunden dauert. Parrish und Davies (1977) führten für diesen Effekt den Begriff des "emergent growth" ein. Fujii et al.(1974) konnten bei verminderter Sauerstoffzufuhr ebenfalls eine Steigerung des Streckungswachstums in Avenakoleoptilen feststellen.

Der von Krauß und Hager (1976) beschriebene Wachstums"burst" nach Anaerobiose wird als ANA-Effekt (Anaerobiose-Aerobiose-Übergangseffekt) bezeichnet. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Effektes (Hager, 1980), ergaben eine mögliche Erklärung des ANA-Effektes.

Eine durch Lactatbildung unter Anaerobiose bedingte Ansäuerung des Cytoplasmas führt zu einer Aktivitätssteigerung der für das Wachstum verantwortlichen ATPase (Hager et al.,1971), die nach Sauerstoffzufuhr in dem genannten Wachstums"burst" zum Tragen kommt.

Lactatbildung bei Pflanzen unter Anaerobiose wurde schon mehrfach nachgewiesen (s.S. 56). Die entsprechende Aktivität des dafür verantwortlichen Enzyms, der Lactatdehydrogenase, konnte gezeigt werden (Davies und Davies, 1972; Barthová et al,,1976, 1977; Betsche et al., 1979; Smith und ap Rees, 1979; u.a.).

In Avenakoleoptilen wurde unter Anaerobiose ebenfalls eine Lactatakkumulation nachgewiesen (Hager, 1980). Wenn diese Milchsäurebildung eine maßgebliche Ursache für den ANA-Effekt darstellt, dann sollte eine Hemmung der Lactatbildung unter Anaerobiose die anschliessende Wachstumssteigerung verhindern.
Dazu wurde Fluorid als Hemmstoff der Glykolyse verwendet, dessen inhibitorische Wirkung auf das Enzym Enolase beschrieben wurde (Miller, 1958; Sarkar et al., 1982).
Anhand der CO_2-Messungen kann gezeigt werden, daß Fluorid unter anaeroben Bedingungen die Glykolyse hemmt (Abb.22). Werden nun wachsende Avenakoleoptilsegmente mit Beginn der Anaerobiose in Fluorid inkubiert, so kann man feststellen, daß der postanaerobe Wachstums"burst" deutlich gehemmt ist (Abb.24, 25). Zu beachten ist, daß in dieser Phase die Koleoptilen nicht mehr unter Fluorideinwirkung stehen, die Stoffwechselvorgänge also unbeeinträchtigt ablaufen können. Die Koleoptilen zeigen zwar noch eine Zunahme des Wachstums, dieses erreicht jedoch in der Endlänge nur das der aerob und nicht mit Fluorid behandelten Koleoptilen. Die gleichzeitige Untersuchung des Lactatgehalts (Abb.27) zeigt deutlich, daß durch Fluorid eine Hemmung der Milchsäuregärung erfolgt. Nach 30-minütiger Anaerobiose konnte keine Lactatakkumulation mehr gemessen werden.
Parrish und Davies (1977) finden das "emergent-growth" auch noch nach Fluorideinwirkung; sie nehmen an, daß hierfür eine Freisetzung von Auxin verantwortlich ist. Diese Unwirksamkeit von Fluorid steht übrigens auch im Gegensatz zu Befunden von Bonner und Thimann (1950), die eine Hemmung des Auxin-induzierten Wachstums feststellen konnten.

Die obigen Befunde deuten darauf hin, daß die Lactatbildung unter Anaerobiose und die damit verbundene, für das Wachstum verantwortliche,Ansäuerung von ausschlaggebender Bedeutung beim ANA-Effekt ist. Schon Warburg et al. (1957) führten eine Ansäuerung unter Anaerobiose bei Chlorella auf Lactatbildung zurück. Bei Maiswurzelspitzen konnte unter Sauerstoffabschluß eine Abnahme des cytoplasmatischen pH-Werts um 0,3 - 0,5 pH-Einheiten gemessen werden, der nach Wiederbelüftung innerhalb von 20 Minuten wieder auf den ursprünglichen Wert ansteigt (Roberts et al., 1982). Die Autoren führen diese pH-Abnahme ebenfalls auf Lactatbildung zurück.

Eine durch Lactat bedingte Schädigung in diesem Zeitraum kann -wie die eigenen Versuche zeigen- ausgeschlossen werden, da die Koleoptilen nach Anaerobiose ihr Wachstum wieder voll aufnehmen und im weiteren Verlauf ein übliches IES-Wachstum ausgelöst werden kann.
Außerdem ist bekannt, daß die unterschiedlichen pH-Optima der LDH und PDC eine unbegrenzte Milchsäurebildung bzw. eine gefährliche pH-Absenkung verhindern. Beide Enzyme wirken als metabolischer pH-stat. LDH wird durch abnehmenden pH gehemmt, gleichzeitig erfolgt eine Aktivitätssteigerung der Pyruvatdecarboxylase und Umschaltung auf Äthanolbildung (Davies, 1973; Davies et al., 1974).

Für eine Bedeutung der cytoplasmatischen pH-Absenkung und eine hierdurch bedingte H^+-ATPase-Aktivitätserhöhung und Stimulierung des Wachstums scheinen auch Versuche mit 2-Naphtylacetat zu sprechen (Abb.28,29).
Nach Vesper und Evans (1979) soll 2-NA eine intrazelluläre Ansäuerung bewirken und so eine Wachstumssteigerung auslösen. Die Zugabe von 2-NA bewirkt bei Avenakoleoptilen schon wenige Minuten danach eine Steigerung des Wachstums. Die Bestimmung des pH-Wertes des Gewebepressaftes (Abb.30), ergibt nach einer Einwirkungszeit von 30 min eine pH-Abnahme von 0,2 pH-Einheiten. Der theoretisch berechenbare pH-Wert einer 100 µM 2-NA-Lösung (Wasser, pH 7) würde 3,38 betragen, also einer pH-Anahme um 3,6 Einheiten entsprechen.
Daraus ist zu schliessen, daß die gemessene pH-Abnahme in Avenakoleoptilen von 0,2 Einheiten durch die Pufferkapazität des Cytoplasmas bedingt ist.
Wichtig ist, darauf hinzuweisen, daß diese Ansäuerung nicht eine Art Säurewachstum induziert, das auch unter N_2 ablaufen kann. Vielmehr zeigen Versuche, bei denen 2-Naphtylacetat unter anaeroben Bedingungen appliziert keine Wachstumssteigerung auslöst. Eine eingeschränkte Aufnahme ist auszuschliessen, da es sich bei 2-NA um eine lipophile Verbindung handelt. Dies kann auch aus folgenden Versuchen geschlossen werden: Es besteht nämlich ein Unterschied ob 2-NA in der post-anaeroben Phase noch einwirkt oder aus dem Medium entfernt wurde.

Im ersten Fall wird der ANA-Effekt weit übertroffen, im zweiten führt die 15-minütige Einwirkungszeit unter Anaerobiose wahrscheinlich zu einer weiteren Ansäuerung, so daß der ANA-Effekt noch um 50 % gesteigert werden kann, jedoch nicht so stark wie in Anwesenheit von 2-NA, wo eine Verdopplung des Effektes erfolgt.
Eine ähnliche Wachstumssteigerung kann auch mit Fluoracetat ausgelöst werden (Abb.19,20,21), unter dessen Einfluß der pH-Wert des Zellsaftes ebenfalls abnimmt (Abb.30). Dabei ist festzustellen, daß nach Fluoracetateinwirkung unter Luft ein Auswechseln des Mediums gegen reinen MES-Puffer eine dem ANA-Effekt ähnliche Wachstumssteigerung bewirkt. Vermutungen, daß unter Fluoracetateinwirkung eine Lactatbildung erfolgt, ließen sich durch entsprechende Bestimmungen nicht bestätigen, obwohl eine Atmungshemmung unter Luft erfolgt (Abb.18). Es ist anzunehmen, daß das in das Cytoplasma aufgenommene Fluoracetat, das nicht metabolisierbar ist, eine pH-Erniedrigung bewirkt.

Wie schon erwähnt, kann durch Fluorid der ANA-Effekt gehemmt werden und zwar jener Abschnitt, der über das Wachstum der Kontrolle zu dieser Zeit hinausgeht. Die Fluorid-behandelten Koleoptilen holen nach Fluoridentfernung das Wachstum der Kontrolle auf (Abb.24), was mit dem "stored-growth" von Ray zu vergleichen ist.
Dies zeigen auch Versuche, bei denen Fluorid unter Luftbedingungen appliziert und anschliessend wieder ausgewaschen wird (Abb.26).
Auch hier erfolgt ein Aufholen des Wachstums bis zur unbehandelten Kontrolle zu dieser Zeit. Der ANA-Effekt ist dem "stored-growth" offensichtlich aufgelagert und beide beruhen auf unterschiedlichen Ursachen.
Ray (1961) erklärte den "stored-growth"-Effekt dadurch, daß er annahm, daß die Wachstumsrate von Reaktionen in der Zellwand abhängig ist und von diesen kontrolliert wird. Ein Substrat X, das verantwortlich sei, würde vom Stoffwechsel kontinuierlich produziert und bei Wachstumshemmungen akkumulieren. Bei Aufhebung der Hemmung wird dieses dann schneller verbraucht und das Wachstum den Punkt der unbehandelten Kontrolle erreicht haben.

Ein wichtiger Unterschied zum ANA-Effekt besteht in der Art der Inhibition des Wachstums. Beim "stored-growth" wird durch Mannitol eine Turgorreduktion erzielt, welche beim ANA-Effekt unter Anaerobiose nicht erfolgt. Eine solche würde sich in einer Schrumpfung, die am Wegaufnehmer leicht festzustellen wäre, zeigen.
Göring et al. (1978) vertreten die Meinung, daß die durch Mannitolbehandlung herbeigeführte Turgorreduktion zu einer Aktivierung der H^+-Sekretion durch eine H^+-Pumpe am Plasmalemma führt. Sie konnten teilweise eine Überkompensation des Wachstums nach Turgorbehandlung feststellen und führten dies auf die unterschiedlichen Wachstumsraten vor der Behandlung zurück. Nur unterhalb einer gewissen Streckungsrate erfolgt anschliessend eine solche Überkompensation, wohingegen bei höheren Wachstumsraten auch kein "stored-growth" mehr auftritt.
Eine ähnliche Abhängigkeit von der Wachstumsrate konnten Cline et al. (1979) bei Hemmung des Säurewachstums durch N_2 feststellen. Bei Aufhebung der Hemmung trat die Wachstumsrate des Säurewachstums wieder ein. Sie folgern, daß bei ihren Versuchen durch N_2 eventuell nur eine Hemmung des endogenen Wachstums erfolgt, welches das Säurewachstum begleitet.
Eine solche Hemmung des endogenen Wachstums unter Anaerobiose kann bei Avenakoleoptilen ebenfalls angenommen werden (Abb.2).
In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß noch nicht eindeutig geklärt ist, ob das endogene und das IES-induzierte Wachstum auf den gleichen Mechanismen basiert (Penny und Penny, 1978).
Cleland (1975) berichtet über mehrere Typen der H^+-Exkretion in Koleoptilen, z.B. über eine basale Protonenpumpe, die nicht durch Cycloheximid hemmbar aber energieabhängig ist. Die Bedeutung einer solchen Protonenpumpe beim ANA-Effekt könnte in Erwägung gezogen werden. Durch Cycloheximid kann keine absolute Hemmung des ANA-Effektes erfolgen (Abb.12). Die auftretende Beeinträchtigung ist mit der im selben Bereich liegenden Atmungshemmung zu erklären (Abb.11).
Solche Atmungshemmungen konnten nach 1-stündiger Einwirkungszeit auch von Bates und Cleland (1979) festgestellt werden.
Es wurde noch nicht gezeigt, daß die durch IES stimulierte und damit für das Wachstum verantwortliche ATPase (Hager et al., 1971) und die

für den ANA-Effekt verantwortliche ATPase dieselben sein müssen, auch wenn sie durch die gleichen Atmungshemmstoffe beeinflusst werden können (Hager, 1980). Deren Wirkung ist durch den Mangel an Energiezufuhr bedingt. Proteinsynthese-Inhibitoren weisen auf andere Abhängigkeiten hin, wie eventuell beim IES-induzierten Wachstum auf die Abhängigkeit der Bildung von Vesikeln (die mit dem Plasmalemma fusionieren) von der Proteinsynthese (Hager et al., 1980). Die Versuche mit Cycloheximid deuten auch darauf hin, daß Zwischenschritte im Wachstum, die durch IES erst eingeleitet werden müssen, beim ANA-Effekt übergangen werden. Dies erklärt auch die Dominanz des ANA-Effektes über das IES-induzierte Wachstum (Krauss und Hager, 1976). Die schon vorhandene Ansäuerung und die damit gesteigerte ATPase-Aktivität überlagert die lag-Phase des IES-Wachstums.

Verwendet man Substanzen, wie DES und DCCD, die in der Literatur als ATPase-Inhibitoren in vitro beschrieben wurden (Beffagna et al., 1979; Hager und Helmle, 1981), um die Auswirkungen auf den ANA-Effekt in vivo zu testen, dann muß man erkennen, daß die Hemmstoffe nicht sehr spezifisch sind: Der ANA-Effekt beim Wachstum ist zwar gehemmt, aber eine entsprechende Atmungshemmung tritt ebenfalls ein (Abb.13-17). Beeinflussungen des Energiestoffwechsels nach DES-Behandlung konnten auch von Balke und Hodges (1979) gezeigt werden; eine 50 %ige Abnahme des ATP-Spiegels konnte gemessen werden. Chastani et al. (1981) konnten eine Hemmung des H^+-Effluxes durch DES feststellen und schliessen anhand weiterer Untersuchungen, daß es die Zellmembran für Protonen permeabel macht. Daß ein Mangel an Energiezufuhr und eine Veränderung der Membranpermeabilität entscheidend für die Wachstumshemmung ist, dafür sprechen auch die Versuche mit IES; der verstärkte H^+-Efflux in die Zellwand und damit das Wachstum werden gehemmt (Abb.14).

Der Wachstums"burst" nach Anaerobiose benötigt offensichtlich eine gesteigerte ATP-Produktion. Dies zeigt sich in der CO_2-Abgabe (Abb.4), wobei ein typischer CO_2-Peak auftritt, der in der Zeitdauer des ANA-effektes beim Wachstum liegt.

Darauf weisen auch die Versuche mit Fluorid hin. Die durch Fluorid bedingte Hemmung der Lactatbildung unter Anaerobiose hat zur Folge, daß keine durch Ansäuerung bedingte ATPase-Aktivierung erfolgt und

so kein Wachstums"burst" ausgelöst wird. Folglich tritt auch kein erhöhter ATP-Verbrauch auf und der CO_2-Peak, d.h. die verstärkte Atmungsrate nach Anaerobiose fehlt (Abb.23).

Als weiterer Hinweis für die Bedeutung der Lactatbildung für den ANA-Effekt dient noch die Feststellung, daß Maiskoleoptilen unter denselben Versuchsbedingungen wie bei Hafer keinen ANA-Effekt beim Wachstum aufweisen (Abb.30). Untersuchungen des Lactatgehalts zeigen, daß dieser im Verhältnis zu dem bei Avenakoleoptilen viel geringer ist (Abb.31). Leblová et al. (1974) konnten auch feststellen, daß Mais bei allen untersuchten Pflanzen die geringste Lactatbildung aufwies.

Im Zusammenhang mit den Versuchen zur Bedeutung der Lactatbildung für den ANA-Effekt war auffallend, daß unter Fluorideinwirkung nach Anaerobiose (Abb.22) die CO_2-Abgabe von Avenakoleoptilen wieder annähernd auf den Wert der Luftkontrolle anstieg, obwohl durch die Beeinträchtigung der Enolaseaktivität eine Atmungshemmung zu erwarten wäre. In der Literatur wird über ähnliche Ergebnisse berichtet. So konnte bei Haferkoleoptilen eine 50 %ige Wachstumshemmung durch Fluorid ausgelöst werden, jedoch keine gleichzeitige Atmungshemmung (Bonner und Thimann, 1950). Bei Erbsenstengeln trat durch Fluorid dieselbe Wachstumshemmung ein bei einer gleichzeitigen Zunahme der Atmungsrate (Christiansen und Thimann, 1950).
Ross et al. (1962) konnten eine Zunahme der CO_2-Abgabe messen, die vorwiegend der Aktivität des Pentosephosphatzyclus zugeschrieben wurde. Sie nehmen an, daß eine Hemmung der Enolase durch Fluorid zu einer Akkumulation von 3-Phosphoglycerinsäure führt, die dann über Triosephosphat zu Hexose resynthetisiert wird. Diese könnte dann für den OPP zur Verfügung stehen. Im Hinblick auf diesen Mechanismus würde die Atmungsrate durch Fluorid nicht beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können auch als Deutung einer ökologischen Anpassungsreaktion der Koleoptilen an zeitweilige anaerobe Verhältnisse angesehen werden. Sie können die damit verbundenen Stoffwechseländerungen in der postanaeroben Phase zu ihrem Vorteil aunützen, indem sie den Wachstumsverlust unter Anaerobiose wieder ausgleichen und sogar überkompensieren.

5. Zusammenfassung

Avenakoleoptilsegmente zeigen nach einer Phase der Anaerobiose nach Wiederzufuhr von Sauerstoff 20 - 30 Minuten lang eine Art Superwachstum (ANA-Effekt = Anaerobiose-Aerobiose-Übergangseffekt), dessen Geschwindigkeit 6 mal höher als vor der anaeroben Behandlung ist.

Während dieser verschiedenen Wachstumsphasen wurden verschiedene Parameter im Stoffwechsel der Koleoptilen untersucht:
Die CO_2-Abgabe der Koleoptilen fällt unter Anaerobiose um 50 % ab und steigt in der postanaeroben Phase schnell wieder an, wobei sich für 20 Minuten, die Zeitdauer des Superwachstums, eine Steigerung der CO_2-Abgabe zeigt, deren Maximum 15 % über dem Wert der Luftkontrolle zu dieser Zeit liegt.
Die O_2-Aufnahme steigt nach N_2-Behandlung ebenfalls auf über 15 % der Kontrolle an.
Dies lässt auf eine erhöhte ATP-Produktion in dieser Zeitspanne schliessen.

Unter Anaerobiose (60 min) nimmt der Äthanolgehalt in Avenakoleoptilsegmenten von 0,9 µmol/g FG der Luftkontrolle auf 3,1 µmol/ g FG zu. Im selben Zeitraum steigt die Äthanolkonzentration im Versuchsmedium der anaerob behandelten Koleoptilen auf 13,7 µM an. Nach Sauerstoffzufuhr fällt der Äthanolgehalt in den Koleoptilen langsam wieder ab und die Konzentration im Außenmedium nimmt vorübergehend zu. Avenakoleoptilen geben offensichtlich einen Teil des gebildeten Äthanols ins Außenmedium ab.

Nach 1-stündiger Anaerobiose ist im Gehalt der reduzierten Pyridinnucleotide in Haferkoleoptilen eine Zunahme von NADH auf das Doppelte und eine NADPH-Abnahme um 85 % zu messen. Bei den oxidierten Formen, NAD^+ und $NADP^+$, ist keine signifikante Konzentrationsänderung festzustellen. Nach Sauerstoffzufuhr werden die Anfangswerte nach 20 min wieder erreicht.

Im Gehalt der freien Aminosäuren ist nach 1-stündiger anaerober Behandlung der Koleoptilen bei bestimmten Aminosäuren eine Veränderung festzustellen. Der %-Anteil am Gesamtgehalt von Alanin und γ-Aminobuttersäure nehmen um das 3 1/2-fache bzw. um das 10-fache zu. Bei Asparaginsäure, Glutamin und Glutaminsäure erfolgt eine

Abnahme (bei Glutaminsäure bis unterhalb der Meßempfindlichkeit). Andere Aminosäuren zeigen keine Veränderungen.

Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der Überflutungstoleranz von Pflanzen diskutiert und Vorschläge zum Ablauf des anaeroben Stoffwechsels von Avenakoleoptilen aufgestellt.

Cycloheximid (100 µM) hemmt den Wachstums-"burst" und die CO_2-Abgabe nach Anaerobiose um 20 %.
ATPase-Hemmstoffe, wie DES (17µM) und DCCD (10µM) hemmen den ANA-effekt um 34 % bzw. 50 %.
Die CO_2-Abgabe wird durch DES um 20 % vermindert. DCCD bewirkt unter aeroben Bedingungen eine Zunahme der CO_2-Abgabe, was auf eine entkoppelnde Wirkung schliessen lässt.
Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß die Hemmstoffe in vivo keine grosse Spezifität aufweisen.

Fluorid (5mM) hemmt die anaerobe Lactatbildung und den Wachstums-"burst" in der postanaeroben Phase. Die Koleoptilen holen das Wachstum bis zur Luftkontrolle zu dieser Zeit auf, ohne jedoch das "Überschiessen" wie beim ANA-Effekt aufzuweisen. Dieses mit dem "stored-growth" vergleichbare Aufholen des Wachstums kann auch nach 30-minütiger aerober Inkubation mit Fluorid ausgelöst werden.
Der ANA-Effekt überlagert den "stored-growth"-Effekt offensichtlich.

Maiskoleoptilsegmente zeigen unter denselben Versuchsbedingungen wie bei Haferkoleoptilen keinen ANA-Effekt beim Wachstum.
Der Lactatgehalt nimmt in Maiskoleoptilen während einer 30-minütigen anaeroben Phase um das 3-fache zu, der in Avenakoleoptilen hingegen im selben Zeitraum um annähernd das 9-fache.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß die Lactatbildung und die dadurch bedingte Ansäuerung des Cytoplasmas unter Anaerobiose eine maßgebliche Ursache des ANA-Effektes ist.

2-Naphtylacetat (100µM) stimuliert das Wachstum bei Avenakoleoptilen. Der ANA-Effekt kann durch 2-NA ebenfalls gesteigert werden.
2-NA bewirkt nach 30-minütiger Inkubation eine pH-Abnahme des Zellsafts von 6.26 der Kontrolle auf 6.07.

Fluoracetat (10mM), unter Anaerobiose appliziert, lässt den Wachstums-"burst" nach Anaerobiose unverändert auftreten. Nach 30 Minuten tritt eine zusätzliche Wachstumssteigerung ein, die auch nach Fluoracetat-inkubation unter aeroben Verhältnissen auftritt.
Der pH-Wert des Zellsafts nimmt unter Fluoracetateinwirkung nach 30 Minuten von 6,26 der unbehandelten Kontrolle auf 6,14 ab.

Diese Versuche weisen auf die Bedeutung der cytoplasmatischen pH-Absenkung für die Stimulierung des Wachstums hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Deutung einer ökologischen Anpassungsreaktion der Koleoptilsegmente an zeitweilige anaerobe Verhältnisse angesehen werden. Avenakoleoptilen können die damit einhergehenden Stoffwechseländerungen in der postanaeroben Phase zu ihrem Vorteil ausnützen, indem sie den Wachstumsverlust unter Anaerobiose wieder ausgleichen und sogar überkompensieren.

6. Literaturverzeichnis

Alpi, A., Beevers, H.: Effects of O_2-concentration on rice seedlings. Plant Physiol. 71, 30 (1983)

Andrews, C.J., Pomeroy, M.K.: Toxicity of anaerobic metabolites accumulating in winter wheat seedlings during ice encasement. Plant Physiol. 69, 120 (1979)

Andrews, C.J., Pomeroy, M.K.: The influence of flooding pretreatment on metabolic changes in winter cereal seedlings during ice encasement.
Can. J. Bot. 61, 142 (1983)

Atwell, B.J., Waters, J., Greenway, H.: The effect of oxygen and turbulence on elongation of coleoptiles of submergence-tolerant and -intolerant rice cultivars.
J. Exp. Bot. 33, 1030 (1982)

Balke, N.E., Hodges, T.K.: Inhibition of adenosine triphosphate activity of the plasmamembrane fraction of oat roots by diethylstilbestrol.
Plant Physiol. 63, 48 (1979)

Balke, N.E., Hodges, T.K.: Comparison of reductions in adenosine triphosphate content, plasma membrane associated adenosine triphosphatase activity and potassium absorption in oat roots by diethylstilbestrol.
Plant Physiol. 63, 53 (1979)

Barclay, A.M., Crawford, R.M.M.: Temperature and anoxic injury in pea seedlings.
J. Exp. Bot. 32, 943 (1981)

Barclay, A.M., Crawford, R.M.M.: Plant growth and survival under strict anaerobiosis.
J. Exp. Bot. 33, 541 (1982)

Barker, J., El Saifi, A.F.: Studies in the respiratory and carbohydrate metabolism of plant tissue. II. Interrelationship between the rates of production of carbon dioxide, lactic acid and of alcohol in potato tubers under anaerobic conditions.
Proc. Roy. Soc. B 140, 508 (1953)

Barthová, J., Borvák, J., Leblová, S.: Isolation and properties of lactate dehydrogenase from germinating pea plants.
Phytochem. 15, 75 (1976)

Barthová, J., Wilhelmová, N., Leblová, S.: The regulation of lactate dehydrogenase activity in soy-bean seedlings.
Biol. Plant. 19, 190 (1977)

Bates, G.W., Cleland, R.E.: Protein synthesis and auxin-induced growth: Inhibitor studies.
Planta 145, 437 (1979)

Beffagna, N., Marrè, E., Cocucci, S.M.: Cation-activated ATPase activity of plasmalemma-enriched membrane preparations from maize coleoptiles.
Planta 146, 387 (1979)

Bertani, A., Brambilla, I., Menegus, F.: Effect of anaerobiosis on rice seedlings: Growth, metabolic rate, and fate of fermentation products.
J. Exp. Bot. 31, 325 (1980)

Bertani, A., Brambilla, J.: Effect of decreasing oxygen concentration on some aspects of protein and amino-acid metabolism in rice roots.
Zeitsch. Pfl. Phys. 107, 193 (1982)

Betsche, T., Bosbach, K., Gerhardt, B.: L-lactate dehydrogenase from leaves of Capsella bursa-pastoris (L.) I. Identification and partial characterisation.
Planta 146, 567 (1979)

Boehringer, Mannheim: Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik. (1979)

Bonner, W.P., Thimann, K.V.: Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. III. The action of some inhibitors concerned with pyruvate metabolism.
Am. J. Bot. 37, 66 (1950)

Chastain, C.J., LaFayette, P.R., Hanson, J.B.: Action of protein synthesis inhibitors in blocking electrogenic H^+-efflux from corn roots.
Plant Physiol. 67, 832 (1981)

Chikova, T.V.: Some regulatory mechanisms in plant adaption to temporal anaerobiosis.
In: Plant Life in Anaerobic Environments
Hook, D.D., Crawford, R.M.M. (eds), 137 -154
Ann Arbor Science (1978)

Cleland, R., Rayle, D.L.: Absence of auxin-induced stored growth in Avena coleoptiles and its implication concerning the mechanism of wall extension.
Planta 106, 61 (1972)

Cleland, R.E.: Auxin-induced hydrogen ion excretion from Avena coleoptiles.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3092 (1973)

Cleland, R.E.: Auxin-induced hydrogen ion excetion: Correlation with growth and control by external pH and water stress.
Planta 127, 233 (1975)

Cleland, R.E.: Kinetics of hormone-induced H^+-excretion.
Plant Physiol. 58, 210 (1976)

Cline, M.G., Evans, M.L., Rehm, M.M.: Cyanide inhibition of acid-induced growth in Avena coleoptile segments.
Plant Physiol. 64, 679 (1979)

Crawford, R.M.M.: The physiological basis of flooding tolerance.
Ber. Dt. Bot. Ges. 82, 111 (1969)

Crawford, R.M.M.: Metabolic adaptions to anoxia.
In: Plant Life in Anaerobic Environments
Hook, D.D., Crawford, R.M.M. (eds) 119 - 136
Ann Arbor Science (1978)

Crawford, R.M.M.: Physiological responses to flooding.
In: Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 12 B
Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (eds), 453 -477
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1982)

Christiansen, G.S., Thimann, K.V.: The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. II. Respiration and ether-soluble material.
Arch. Biochem. 26, 248 (1950)

Davies, D.D.: Control of and by pH.
Symp. Soc. Exp. Biol. 27, 513 (1973)

Davies, D.D., Kenworthy, P.: The control of the production of lactate and ethanol by higher plants.
Planta 118, 297 (1974)

Davies, D.D.: Anaerobic metabolism and the production of organic acids.
In: The Biochemistry of Plants Vol. 2, 581 -611
Stumpf, P.K., Conn, E.E. (eds)
Acad. Press (1980)

Dixon, R.O.D., Fowden, L.: γ-aminoacid metabolism in plants.
Part 2. Metabolism in higher plants.
Ann. Bot. 25, 513 (1961)

Effer, W.R., Ranson, S.L.: Some effects of oxygen concentration on levels of respiratory intermediates in buckwheat seedlings.
Plant Physiol. 42, 1053 (1967 b)

Effer, W.R., Ranson, S.L.: Respiratory metabolism in buckwheat seedlings.
Plant Physiol. 42, 1042 (1967 a)

Ellis, R.J., MacDonald, J.R.: Specificity of cycloheximide in higher plant systems.
Plant Physiol. 46, 227 (1970)

Forti, G., Tognoli, C., Parisi, B.: Purification from pea leaves of a phosphatase that attacks nucleotides.
Biochim. Biophys. Acta 62, 251 (1962)

Fujii, T., Shimokoriyama, M., Ichimura, H.: Stimulation of Avena coleoptile growth by reduction of oxygen supply.
Planta 115, 345 (1974)

Girton, R.: Effects of oxygen concentration on the respiration of exiced root-tip-segments of maize and rice, and of germinating grains of rice and buckwheat.
Phys. Plant. 45, 58 (1979)

Göring, H., Bleiss, W., Kretschmer, H.: Stimulated elongation growth of coleoptile segments as a consequence of activated H^+-secretion after temporary turgor reduction.
Biochem. Phys. Pfl. 173, 373 (1978)

Hager, A.: Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung. Beziehungen zur Photophosphorylierung.
Planta 89, 224 (1969)

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A.: Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum.
Planta 100, 47 (1971)

Hager, A., Frenzel, R., Laible, D.: ATP-dependent proton transport into vesicles of microsomal membranes of zea mays coleoptiles.
Z. Naturforsch. 35 c, 783 (1980)

Hager, A.: Avena coleoptile segments: Hyperelongation growth after anaerobic treatment.
Z. Naturforsch. 35 c, 794 (1980)

Hager, A., Helmle, M.: Properties of an ATP-fueled, Cl^--dependent proton pump localized in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles.
Z. Naturforsch. 36 c, 997 (1981)

Hodges, T.K.: ATPase associated with membranes of plant cell.
In: Encyclopedia of Plant Physiology Vol II A, 260 -283
Lüttge, U., Pitman,M.G. (eds)
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1976)

Inatomi, K., Slaughter, J.C.: The role of glutamate decarboxylase and γ-aminobutyric acid in germinating barley.
J. Exp. Bot. 22, 561 (1971)

Inatomi, K., Slaughter, J.C.: Glutamate decarboxylase from barley embryos and roots.
Biochem. J. 147, 479 (1975)

Jackson, M.B., Herman, B., Goodenough, A.: An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants.
Plant, Cell and Environ. 3, 243 (1980)

Jacobs, M., Ray, P.M.: Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea.
Plant Physiol. 58, 203 (1976)

Kennedy, R.A., Barret, S.C.H., Van der Zee, D., Rumpho, M.E.: Germination and seedling growth under anaerobic conditions in Echinochloa crus-galli (Barnyard grass).
Plant, Cell and Envir.3, 243 (1980)

Krauss, A., Hager, A.: Wachstums"burst" nach Anaerobiose: Ein "stored-growth"-Effekt beim Streckungswachstum von Koleoptilen.
Z. Naturf. 31 c, 312 (1976)

Leblová, S., Sinecká, E., Vaníčková, V.: Pyruvate metabolism in germinating seeds during natural anaerobiosis.
Biol. Plant. 16, 406 (1974)

Lendzian, K.J.: Metabolism of specifically labeld glucose, glucose-1-phosphate, and glucose-6-phosphate via the oxidative pentose phosphate cycle in a reconstituted spinach chloroplast system in darkness and in th light.
Plant Physiol. 66, 8 (1980)

McManmom, M., Crawford, R.M.M.: A metabolic theory of flooding tolerance: The significance of enzyme distribution and behaviour.
New Phytol. 70, 299 (1971)

Miflin, B.J., Lea, P.J.: Amino acid metabolism.
Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 299 (1977)

Miller, G.W.: Properties of enolase in extracts of pea seeds.
Plant Physiol. 33, 199 (1958)

Morohashi, L.: Some events of glucose catabolism occuring in the early imbibitional stage of germination of Phaseolus mungo seeds.
Z. Pfl. Physiol. 90, 249 (1978)

Naylor, A.W., Tolbert, N.E.: Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves.
Physiol. Plant. 9, 220 (1956)

Öpik, H.: Effects of anaerobiosis on respiratory rate, cytochrome oxidase activity and mitochondrial structures in coleoptiles of rice (Oryza sativa).
J. Cell Sci. 12, 725 (1973)

Parrish, D.J., Davies, P.J.: The influence of aging conditions on the short term growth of green pea stem segments.
Plant Physiol. 55, 586 (1975)

Parrish, D.J., Davies, P.J.: Emergent growth. An auxin-mediated response.
Plant Physiol. 59, 745 (1977)

Parrish, D.J., Davies, P.J.: On the relationship between extracellular pH and the growth of exciced pea stem segments.
Plant Physiol. 59, 574 (1977)

Penny, P., Penny, D.: Rapid responses to phytohormones.
In: Phytohormones and related compounds, Vol. II
Letham, Goodwin, Higgins (eds)
Elsevier/North-Holland, Biomedical Press (1978)

Pomeroy, M.K., Andrews, C.J.: Metabolic and ultrastructural changes associated with flooding at low temperature in winter wheat and barley.
Plant Physiol. 64, 635 (1979)

Pradet, A., Bomsel, J.L.: Energy metabolism in plants under hypoxia and anoxia.
In: Plant Life in Anaerobic Environments
Hook, D.D., Crawford, R.M.M. (eds), 89 -118
Ann Arbor Science (1978)

Rayle, D.L., Cleland, R.E.: The in-vitro acid-growth response: Relation to in-vivo growth response and auxin action.
Planta 104, 282 (1972)

Rayle, D.L., Cleland, R.E.: Control of plant cell enlargement by hydrogen ions.
Curr. Top. Dev. Biol. 34, 187 (1977)

Roberts, J.K.M., Wemmer, D., Ray, P.M., Jardetzky, O.: Regulation of cytoplasmic and vacuolar pH of maize root tips under different experimental conditions.
Plant Physiol.69, 1344 (1982)

Ross, C.W., Wiebe, H.H., Miller, G.W.: Effect of fluoride on glucose metabolism in plant leaves.
Plant Physiol. 37, 305 (1962)

Rumpho, M.E., Kennedy, R.A.: Anaerobic metabolism in germinating seeds of Echinochloa crus-galli (Barnyard grass).
Plant Physiol. 68, 165 (1981)

Rumpho, M.E., Kennedy, R.A.: Anaerobiosis in Echinochloa crus-galli (Barnyard grass) seedlings . Intermediary metabolism and ethanol tolerance.
Plant Physiol. 72, 44 (1983)

Rydström, J.: Energy-linked nicotineamide nucleotide transhydrogenases.
Biochim. Biophys. Acta 463, 155 (1977)

Saglio, P.H., Raymond, P., Pradet, A.: Metabolic activity and energy charge of exciced maize root tips under anoxia.
Plant Physiol. 66, 1053 (1980)

Sarkar, R.K., Banderjee,A., Mukherji,S.: Effects of toxic concentrations of natrium fluoride on growth and enzyme activities of rice (Oryza sativa) and jute (Corchorus olitorius L.) seedlings.
Biol. Plant. 24, 34 (1982)

Sherwin, T., Simon, E.W.: The appearance of lactic acid in Phaseolus seeds germinating under wet conditions.
J. Exp. Bot. 20, 776 (1969)

Smith, A.M., ap Rees, T.: Pathway of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants.
Planta 146, 327 (1979 b)

Smith, A.M., ap Rees, T.:Effects of anaerobiosis on carbohydrate oxidation by roots of Pisum sativum.
Phytochem. 18, 1453 (1979a)

Stout, R.G., Cleland, R.E.: Evidence for a Cl^--stimulated Mg-ATPase proton pump in oat root membranes.
Plant Physiol. 69, 798 (1982)

Streeter, J.G., Thompson, J.F.: anaerobic accumulation of γ-aminobutyric acid and alanin in radish leaves (Raphanus sativus L.).
Plant Physiol. 49, 572 (1972)

Streeter, J.G., Thompson, J.F.: In vivo and in vitro studies on amino-butyric acid metabolism with the radish plant.
Plant Physiol.49, 579 (1972)

Thompson, J.F., Stewart, C.R., Morris, C.J.: Changes in amino acid content of excised leaves during incubation.
I. The effect of water content of leaves and atmospheric oxygen level.
Plant Physiol. 41, 1578 (1966)

Vesper, M.J., Evans, M.L.: Nonhormonal induction of H^+-efflux from plant tissues and its correlation with growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6366 (1979)

Wager, H.G.: The effect of anaerobiosis on acids of the tricarboxylic acid cycle in peas.
J. Exp. Bot. 12, 34 (1961)

Warburg, O., Gewitz, H.-S., Völker, W.: D-(-)-Milchsäure in Chlorella.
Z. Naturforsch. 12 b, 722 (1957)

Werner, D., Stipf, R., Abramowski, R., Fiedler, U.: Ecology of nitrogen fixation in soils and rhizisheres. V. Oxygen limited growth and N-metabolism in wheat roots.
Z. Pfl. Physiol. 100, 217 (1980)

Yamamoto, Y.: Variation of nicotineamide adenine dinucleotide phosphate level in bean hypocotyls in relation to O_2-concentration.
Plant Physiol. 41, 519 (1966)

Zembianukhin, A.A., Ivanov, B.F.: Metabolism of organic acids of plants in the condition of hypoxia.
In: Plant Life in Anaerobic Environments
Hook, D.D., Crawford,R.M.M. (eds) pp 203
Ann Arbor Science (1978)

Zurfluh, L.L., Guilfoyle, T.J.: Auxin-induced changes in the population of translatable mesenger RNA in elongating maize coleoptile segments.
Planta 156, 525 (1982)

7. Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALA	Alanin
ASP	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
CH	Cycloheximid
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DES	Diethylstilbestrol
DPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
FG	Frischgewicht
GABA	γ-Aminobuttersäure
GLN	Glutamin
GLU	Glutaminsäure
G6PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
IES	Indolessigsäure
LDH	Lactatdehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)-Äthansulfonsäure
2-NA	2-Naphtylacetat
NAD(H)	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
OPP	Oxidativer Pentosephosphatcyclus
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PMS	Phenazimethosulfat
RNA	Ribonucleinsäure
URAS	Ultrarot-Absorptionsschreiber

Lebenslauf

29.04.52	Geboren in Nagold als Tochter des Gustav Abele und seiner Frau Anna, geb. Steimle
1959 - 1963	Grundschule in Nagold
1963 - 1971	Gymnasium Nagold
19. 06.71	Abitur
1971 -1977	Studium der Biologie und Geographie an der Universität Tübingen
1976	Staatsexamen in Biologie
1977	Staatsexamen in Georaphie
1977	Wissenschaftliche Arbeit am Institut für Biologie I, Universität Tübingen, unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Hager mit dem Thema: Der Einfluß des CO_2-Partialdruckes auf die phototropische Krümmungsreaktion von Avena-koleoptilen
1978 - 1983	Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie im Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hager über das Thema: Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des zeitlich begrenzten Superwachstums bei Avena-koleoptilen nach Anaerobiose
1978 -1981	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie

Meine akademischen Lehrer waren:
Ammermann, Apfelbach, Barth, Bentrup, Blume, Brändle, Bunke, Dobat, Drumm, Friz, Grees, Grell, Hager, Hannß, Harder, Hurka, Karger, Kulzer, Mickoleit, Möhres, Netzel, Neugebaur, Oberwinkler, Peters, Rähle, Röttger, Rüdorff, Seiler, Seyffert, Schröder, Schwartz, Schwemmle, Westphal, Wilhelmy.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353